



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/31, C07K 14/22, 16/12, A61K 39/095, C12Q 1/68, G01N 33/53	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/02547 (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01295 (22) Date de dépôt international: 11 juillet 1997 (11.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/08768 12 juillet 1996 (12.07.96) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). SMITHKLINE BEECHAM [GB/GB]; New Horizons Court, Brentford TW8 9EP (GB). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): NASSIF, Xavier [FR/FR]; 30, rue Labrouste, F-75015 Paris (FR). TINSLEY, Colin [FR/FR]; 156, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR). ACHTMAN, Mark [DE/DE]; Neuenburgerstrasse 16, D-10969 Berlin (DE). RUELLE, Jean-Louis [BE/BE]; Résidence de la Lyre 18, B-1300 Limal (BE). VINALS, Carla [BE/BE]; Rue des Acacias 30, B-4000 Liège (BE).		(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: DNA AND SPECIFIC PROTEINS OR PEPTIDES OF THE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> SPECIES BACTERIA, METHOD FOR OBTAINING THEM AND THEIR BIOLOGICAL APPLICATIONS (54) Titre: ADN ET PROTEINES OU PEPTIDES SPECIFIQUES DES BACTERIES DE L'ESPECE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> , LEURS PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES (57) Abstract <p>The DNA of the invention are characterised in that they concern the whole or part of genes, with their reading frame, to be found in <i>Neisseria meningitidis</i>, but not in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, or in <i>Neisseria lactamica</i> except the genes involved in the biosynthesis of the polysaccharide capsule, <i>frpA</i>, <i>frpC</i>, <i>opc</i>, <i>porA</i>, rotamase the sequence IC1106, IgA protease, pilline, pilC, transferrin binding proteins and opacity proteins. The invention also concerns the polypeptides corresponding to these DNA and the antibodies directed against these polypeptides. It is applicable in the prevention and the detection of meningococcus induced infections and meningitis.</p> (57) Abrégé <p>Les ADN de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de tout ou partie de gènes, avec leur phase de lecture, présents chez <i>Neisseria meningitidis</i>, mais absents soit chez <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, soit chez <i>Neisseria lactamica</i> à l'exception des gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule polysaccharidique, <i>frpA</i>, <i>frpC</i>, <i>opc</i>, <i>porA</i>, rotamase, de la séquence IC1106, des IgA protéases, de la pilline, de pilC, des protéines qui lient la transferrine et des protéines d'opacité. L'invention vise également les polypeptides correspondant à ces ADN et les anticorps dirigés contre ces polypeptides. Applications à la prévention et à la détection d'infections à méningocoques et de méningites.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkémistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

ADN et protéines ou peptides spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis*, leurs procédés d'obtention et leurs applications biologiques.

5 L'invention est relative aux ADN, et aux protéines et peptides, spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis* (ci-après en abrégé Nm), à leur procédé d'obtention et à leurs applications biologiques, en particulier pour la prévention et la détection
10 d'infections à méningocoques et de méningites.

On sait que Nm constitue l'un des principaux agents de la méningite cérébrospinale.

Des études menées aux Etats-Unis ont montré que de 5 à 10% de la population sont porteurs asymptomatiques de
15 souche(s) de Nm. Les facteurs de transmission de Nm sont mal connus. Pour une proportion des personnes infectées, Nm pénètre le flux sanguin, où elle peut provoquer une méningococcémie et/ou progresse dans le flux cérébrospinal pour provoquer une méningite. Sans
20 traitement antibiotique rapide, l'infection peut se développer de manière fulgurante et devenir mortelle.

Comparée aux autres pathogènes, Nm présente la caractéristique de pouvoir franchir la barrière hémato-encéphalique afin de coloniser les méninges. L'étude de
25 la pathogénicité de Nm est donc non seulement importante dans le cadre de la méningite, mais aussi dans le cadre de toute maladie touchant le cerveau.

On conçoit alors l'intérêt de disposer d'outils spécifiques de cette espèce bactérienne pour les
30 applications envisagées ci-dessus.

Nm est génétiquement très proche des bactéries de l'espèce *Neisseria gonorrhoeae* (ci-après en abrégé Ng) et de l'espèce *Neisseria lactamica* (ci-après en abrégé Nl). Leur pathogénicité est toutefois très différente.

Nm colonise le nasopharynx, puis traverse l'épithélium pharyngé pour envahir l'espace sous-muqueux, étant alors responsable de septicémie et de méningite.

5 Ng est surtout responsable d'infections localisées du tractus génito-urinaire. Elle colonise la muqueuse génitale, puis traverse l'épithélium, envahit ensuite le sous-épithélium où elle se multiplie et est responsable d'une forte réaction inflammatoire. Des infections
10 gonococciques disséminées sont possibles, mais restent rares et sont le fait de seulement certaines souches. Quant à Nl, on considère qu'il s'agit d'une souche non pathogène, étant donné qu'elle n'est pas responsable d'invasion localisée ou générale.

15 Ainsi, une première considération amène à prendre en compte le fait que Nm et Ng, tout en étant des bactéries très proches, présentent des pouvoirs pathogènes différents.

20 Le génome de ces bactéries étant fortement homologue, seules des parties limitées du génome de Nm et de Ng doivent coder pour des facteurs de virulence spécifiques, responsables de leur pathogénèse.

Il est clair que Nm présente par rapport à Ng des séquences d'ADN qui lui sont spécifiques et qui doivent
25 intervenir au niveau de l'expression de son pouvoir pathogène spécifique.

L'espèce Nm est subdivisée en sérogroupes basés sur la nature des polysaccharides capsulaires.

30 Au moins 13 sérogroupes ont été définis, parmi lesquels les sérogroupes A, B et C sont responsables d'environ 90% des cas de méningites. Les groupes A et C sont observés dans les formes épidémiques de la maladie. Le groupe B est le séro groupe le plus couramment isolé en Europe et aux Etats-Unis.

La capsule, présente chez Nm et absente chez Ng, a servi de base pour l'élaboration de vaccins anti-méningite méningococcique.

Les polysaccharides de la capsule de Nm ont été
5 utilisés pour l'élaboration d'un vaccin qui s'est montré efficace pour prévenir chez les adultes la méningite provoquée par les méningocoques de sérogroupes A, C, W135 et Y.

Cependant, le polysaccharide de Nm groupe C s'est
10 révélé faiblement immunogène chez les enfants de moins de deux ans, alors que le polysaccharide de Nm groupe B est non immunogène chez l'homme et partage des épitopes avec des glycoprotéines d'adhésion présentes dans les cellules neuronales humaines.

15 Il n'existe donc pas de vaccin universel capable de prévenir les infections provoquées par l'ensemble des sérogroupes des méningocoques et capable de répondre à la variabilité antigénique propre aux pathogènes bactériens en général et à Nm en particulier.

20 En raison de la réactivité croisée du polysaccharide groupe B de Nm avec les antigènes humain, de la multiplicité des sérogroupes et de la variabilité antigénique de Nm, les stratégies proposées à ce jour ne peuvent conduire à un vaccin efficace dans toutes les
25 situations.

Les recherches se sont alors concentrées sur l'étude d'éléments caractéristiques responsables de la spécificité de la pathogénèse méningococcique.

La plupart des gènes qui ont été étudiés dans l'une
30 quelconque des deux bactéries Nm ou Ng possèdent leur homologue dans la deuxième bactérie.

De la même manière, la plupart des facteurs de virulence jusqu'ici identifiés dans Nm ont une contrepartie dans Ng, c'est-à-dire la piline, les

protéines PilC, les protéines d'opacité et les récepteurs de la lactoferrine et de la transferrine.

Les attributs spécifiques des méningocoques caractérisés dans l'art antérieur sont la capsule, les
5 protéines Frp analogues aux toxines RTX, les protéines de la membrane externe Opc, la peroxydase glutathione, la porine PorA et le gène rotamase.

Parmi ceux-ci, seule la capsule est invariablement présente dans les souches virulentes de Nm. Cependant, de
10 nombreux pathogènes extra-cellulaires possèdent une capsule sans pour autant traverser la barrière hémato-encéphalique.

Des attributs non encore identifiés doivent donc être responsables de la spécificité de la pathogénèse
15 meningococcale. Ces attributs sont vraisemblablement codés par des séquences d'ADN présentes parmi les méningocoques mais absentes chez les gonocoques.

Les inventeurs ont développé une nouvelle voie d'approche basée sur l'isolement soustractif des gènes
20 Nm-spécifiques, ces gènes devant être liés à la pathogénèse spécifique de Nm, et, plus particulièrement au franchissement de la barrière hémato-encéphalique.

La méthode soustractive développée dans l'art antérieur a abouti à la production de marqueurs
25 épidémiologiques pour certains isolats de Nm. Ces marqueurs sont d'une utilité limitée : ils ne couvrent pas l'ensemble des sérogroupes de l'espèce Nm.

Par contraste avec ces études, les travaux des inventeurs ont conduit, en confrontant Nm à l'ensemble du
30 chromosome de Ng, cisailé de manière aléatoire, à la mise au point de moyens pour cloner l'ensemble des ADN présents chez Nm et absents chez Ng, fournissant ainsi des outils de haute spécificité vis-à-vis de Nm et permettant ainsi de répondre pour la première fois à la
35 variabilité génétique de l'espèce.

Les termes "présent" et "absent", tel qu'utilisés dans la description et les revendications en rapport avec les ADN d'une souche, ou leurs produits d'expression, sont appréciés par rapport à des conditions d'hybridation identiques (16h à 65°C, avec NaPO₄ 0,5M, pH 7,2; EDTA-Na 0,001M, 1%, 1% d'albumine de sérum bovin et 7% de dodécylsulfate de sodium), en utilisant une même sonde et une même intensité de marquage de la sonde, une même quantité d'ADN chromosomique et un même élément de comparaison (ADN chromosomique de la souche homologue). Ainsi, on considère que l'ADN est présent lorsque le signal obtenu avec la sonde est pratiquement le même que celui obtenu avec la souche de référence.

En revanche, on considère que l'ADN est absent lorsque ce signal apparaît très faible.

Une deuxième considération sur les pathogénicités de Nm et de Ng conduit à prendre en compte leur aptitude commune à coloniser et à pénétrer la muqueuse puis à envahir l'espace sous-épithélial de cette dernière. Il est fort vraisemblable que ce processus implique des facteurs de virulence communs aux deux pathogènes. A cet égard, on sait qu'un certain nombre de facteurs de virulence ont été déjà identifiés chez Nm et chez Ng, comme les protéines pili, PilC, les protéines d'opacité, les protéases d'IgA, les protéines de liaison à la transferrine et à la lactoferrine, et des lipooligosaccharides.

La démarche des inventeurs s'est donc étendue à la recherche de régions de Nm, spécifiques de Nm et de Ng, mais absentes chez l'espèce non pathogène N1, et d'une manière générale à la recherche, par les moyens mis au point conformément à l'invention, de régions chromosomiques d'ADN et de leurs produits d'expression, spécifiques d'une espèce donnée.

L'invention a donc pour but de fournir des ADN de Nm spécifiques de son pouvoir pathogène et des moyens pour les obtenir, notamment en élaborant des banques formées exclusivement de ces ADN Nm-spécifiques.

5 Elle vise également les produits dérivés de ces séquences d'ADN.

L'invention vise également la mise à profit des caractères spécifique et exhaustif de ces banques pour élaborer des outils utilisables notamment en diagnostic,
10 thérapie et prévention.

Les ADN de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de tout ou partie de gènes, avec leur phase de lecture, présents chez *Neisseria meningitidis*, mais absents soit chez *Neisseria gonorrhoeae*, soit chez
15 *Neisseria lactamica*, à l'exception des gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule polysaccharidique, *frpA*, *frpC*, *opc*, *por A*, *rotamase*, de la séquence IS1106, des IgA protéases, de la pilline, de *pilC*, des protéines qui lient la transferrine et des protéines d'opacité.

20 Comme précisé plus haut, les termes "présents" et "absents" sont appréciés par rapport aux conditions d'hybridation telles qu'utilisées dans les Southern blots décrits dans les exemples et rappelées plus haut.

On notera que ces ADN englobent les variants dès
25 lors qu'ils expriment une fonction propre à l'espèce Nm, plus particulièrement un phénotype retrouvé uniquement chez Nm ou en commun exclusivement avec Ng.

Selon un aspect majeur, ces ADN sont spécifiques de la pathogénécité de *Neisseria meningitidis* et ce, en
30 dépit de la variabilité génétique de cette espèce.

Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits ADN sont spécifiques de Nm par rapport à Ng.

Plus particulièrement, les ADN Nm-spécifiques sont absents de *Neisseria lactamica* et de *Neisseria cinerea*.

De façon surprenante, la majorité des différences génétiques entre les souches de méningocoques et celles de gonocoques apparaissent regroupées en régions distinctes, qui correspondraient à des îlots de pathogénécités comme précédemment décrit pour *E. coli* et *Y. pestis*.

Ainsi, dans une disposition préférée de l'invention, ces ADN sont également caractérisés en ce qu'ils comprennent une ou plusieurs séquence(s), telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* Z2491 entre *tufA* et *pilT*, ou région 1 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou les séquence(s) ci-dessus, sous réserve d'être spécifique(s) de *Neisseria meningitidis*.

Par "spécifique", on désigne dans la description et les revendications les séquences de nucléotides qui ne s'hybrident qu'avec celles de Nm, dans des conditions d'hybridation données dans les exemples et rappelées plus haut.

On notera à cet égard que, de manière générale, lorsqu'on fait référence dans la description et les revendications à "tout ou partie" d'une séquence, cette expression doit être appréciée par rapport à la spécificité définie ci-dessus.

De même, tout ou partie d'un peptide, ou un fragment d'un peptide ou d'un anticorps désigne un produit présentant les propriétés biologiques respectivement du peptide natif ou de l'anticorps formé contre le peptide.

Dans la région 1, sont regroupés des gènes de la capsule de *Neisseria meningitidis*.

Des ADN de ce type présentent une séquence correspondant, pour tout ou partie, à SEQ ID N°9, 13, 22 ou 30, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou présentent une séquence capable de s'hybrider avec

au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

Dans une autre disposition préférée de l'invention, ces ADN sont également caractérisés en ce qu'ils sont constitués par une ou plusieurs séquence(s), telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* 22491 entre *pilQ* et *λ740*, ou région 2 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou les séquence(s) ci-dessus, sous réserve d'être spécifique(s) de *Neisseria meningitidis*.

Des ADN selon cette disposition présentent une séquence correspondant, pour tout ou partie, à SEQ ID N°1, 2, 4, 6, 7, 10, 15, 31 ou 34, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou présentent une séquence capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

L'invention vise tout spécialement tout ou partie de la séquence d'ADN SEQ ID N°36 de 15620 pb, et les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture SEQ ID N°37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44 et SEQ ID N° 45.

Dans encore une autre disposition préférée de l'invention, ces ADN sont également caractérisés en ce qu'ils sont constitués par une ou plusieurs séquence(s), telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* 22491 entre *argF* et *opaB*, ou région 3 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou les séquence(s) ci-dessus, sous réserve d'être spécifique(s) de *Neisseria meningitidis*.

Des ADN selon cette disposition sont caractérisés en ce qu'ils présentent une séquence correspondant pour tout ou partie à SEQ ID N°8, 21, 23, 25, 26, 28, 29, 32 ou 35, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb

de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou, présentent une séquence capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

5 Les régions 1, 2, 3, identifiées ci-dessus, présentent une forte proportion de séquences *Neisseria meningitidis* spécifiques, et entrent également dans le cadre de l'invention.

10 D'autres ADN représentatifs de la spécificité vis-à-vis de *Neisseria meningitidis* présentent une ou plusieurs séquences telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* Z2491, mais ne font pas partie des régions 1, 2, 3 définies ci-dessus.

15 De tels ADN comprennent une ou plusieurs séquences correspondant pour tout ou partie à SEQ ID n°3, 5, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 24, 27 ou 33, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou présentent une séquence capable de s'hybrider avec de telles
20 séquences.

Compte tenu des applications particulièrement visées, l'invention concerne plus spécialement les ADN ci-dessus impliqués dans la pathogénèse de l'organisme bactérien.

25 Elle vise, en particulier, les ADN répondant à au moins l'une des caractérisations données ci-dessus, et codant pour une protéine exportée au-delà de la membrane cytoplasmique et/ou dont tout ou partie de leur séquence correspond à la région conservée desdits ADN.

30 Ainsi, selon un autre mode de réalisation de l'invention, les ADN sont communs avec ceux de Ng, mais sont absents de chez N1.

Il s'agit plus spécialement d'ADN présents sur la région 4 (arg J à reg F) ou sur la région 5 (marqueur
35 lambda 375 à pen A) sur le chromosome de Nm Z2491 et/ou

capables de s'hybrider avec lesdits ADN présents, sous réserve d'être spécifiques de Nm et de Ng par rapport à N1.

5 Par "spécifique de Nm et de Ng par rapport à N1", on désigne des ADN qui s'hybrident avec les ADN de Nm et de Ng dans les conditions d'hybridation des exemples (voir en particulier l'exemple 4).

10 Les ADN des régions 4 et 5, et ceux capables de s'hybrider avec ces ADN, sous réserve d'exprimer les fonctions propres à Nm, présentent l'avantage d'intervenir de manière majeure dans la virulence de Nm, en étant impliqués dans l'étape de colonisation et de pénétration initiales et dans la dissémination septicémique.

15 Selon d'autres dispositions, l'invention vise les vecteurs de transfert et d'expression, tels que plasmides, cosmides ou bactériophages, comportant au moins un ADN tel que défini ci-dessus.

20 Elle vise aussi les cellules hôtes telles que transformées par au moins un ADN tel que défini ci-dessus.

25 D'autres cellules hôtes de l'invention comportent des gènes ou des fragments de gènes spécifiques de Nm et sont caractérisées en ce que leur chromosome est délété d'au moins un ADN selon l'invention, en particulier d'un ADN responsable de la pathogénicité. Il s'agit plus spécialement de cellules bactériennes, notamment de Nm.

30 L'invention a également pour objet les ARN dont la séquence correspond pour tout ou partie à la transcription d'au moins une séquence ou fragment de séquence d'ADN tel que défini ci-dessus.

Les acides nucléiques anti-sens des ADN tels que définis ci-dessus, ou de fragments de ces ADN, font également partie de l'invention.

Ces acides nucléiques anti-sens portent le cas échéant au moins un substituant telle qu'un groupe méthyle et/ou un groupe glycosyle.

5 D'autres produits entrant dans le champ de l'invention sont constitués par des polypeptides.

Ces polypeptides sont caractérisés en ce qu'ils présentent un enchaînement d'acides aminés correspondant à tout ou partie d'une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis dans ce qui précède, ou telle
10 que déduite des séquences de ces acides nucléiques.

Il s'agit avantagement de polypeptides correspondant à tout ou partie de polypeptides exportés au-delà de la membrane cytoplasmique, plus spécialement de polypeptides correspondant à tout ou partie de ceux
15 tels que codés par une région conservée.

En variante, les polypeptides de l'invention peuvent être modifiés par rapport à ceux correspondant aux séquences d'acides nucléiques, et ce de manière à être particulièrement adaptés pour une application donnée, en
20 particulier une application vaccinale.

Par modification, on entend toute altération, déletion, substitution chimique, dès lors qu'elle n'affecte pas les propriétés biochimiques des polypeptides natifs correspondants, plus spécialement des
25 protéines fonctionnelles telles qu'exportées au niveau du périplasme et de la membrane externe.

D'autres produits conformes à l'invention sont constitués par les anticorps dirigés contre les polypeptides ci-dessus.

30 L'invention vise ainsi les anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent au moins un épitope d'un polypeptide tel qu'évoqué plus haut.

Elle vise également les fragments de ces anticorps,
35 plus particulièrement les fragments Fv, Fab, Fab'2.

Les anti-anticorps capables de reconnaître les anticorps définis ci-dessus, ou leurs fragments, selon une réaction de type antigène-anticorps, font également partie de l'invention.

5 Conformément à l'invention, les différents produits considérés ci-dessus sont obtenus par voie de synthèse et/ou biologique en opérant selon les techniques classiques.

10 Les acides nucléiques peuvent être également obtenus à partir de banques constituées d'ADN Nm- spécifiques, telles qu'élaborées selon une technique soustractive, cette technique comprenant :

- le mélange de deux populations d'ADN,
- la réalisation d'au moins une itération
- 15 d'hybridation-amplification soustractive, et
- la récupération du ou des ADN souhaités, suivie le cas échéant de leur purification avec l'élimination des séquences redondantes.

Conformément à l'invention, les deux

20 populations d'ADN proviennent respectivement d'une souche de *Neisseria meningitidis*, dite souche de référence, pour laquelle la banque spécifique doit être constituée, et d'une souche de *Neisseria*, dite souche de soustraction, présentant une homologie en séquences primaires d'ADN

25 supérieure à environ 70% avec la souche de *Neisseria meningitidis*, les séquences d'ADN des souches de soustraction et de référence étant telles qu'obtenues respectivement par cisaillement aléatoire, et par clivage par une endonucléase de restriction capable de produire

30 des fragments de taille inférieure à environ 1kb.

L'invention vise en particulier un procédé d'obtention de banques d'ADN *Neisseria meningitidis* spécifiques, comportant les étapes de :

- cisaillement aléatoire de l'ADN chromosomique
- 35 d'une souche *Neisseria gonorrhoeae*, dite souche de

soustraction, notamment par passages répétés à travers une seringue,

- clivage de l'ADN chromosomique d'une souche de *Neisseria meningitidis*, dite souche de référence, de préférence par une enzyme de restriction produisant des fragments de taille inférieure à 1kb environ,

- ligature des fragments d'ADN de la souche de référence, clivés par l'enzyme de restriction, avec des amorces oligonucléotidiques appropriées,

- réalisation d'une itération d'hybridation-amplification soustractive par :

. mélange des deux populations d'ADN dans des conditions appropriées pour l'hybridation des séquences homologues, puis

. amplification des fragments auto-réannelés et récupération de ces fragments,

. digestion de ces fragments par une enzyme de restriction, et re-ligature à des amorces oligonucléotides suivie d'une

- purification de l'ADN ligaturé, et le cas échéant, d'une nouvelle itération d'hybridation soustractive, comportant le mélange de fragments d'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* cisailé comme indiqué ci-dessus avec les fragments d'ADN de *Neisseria meningitidis* issus de l'itération précédente, suivi, si on le souhaite du clonage des ADN de la banque.

Les amorces utilisées sont des amorces oligodésoxynucléotidiques adaptées à l'endonucléase de restriction utilisée et permettant une insertion dans un site de clonage, tel que le site EcoRI du plasmide pBluescript. On choisira avantageusement de telles amorces parmi les oligodésoxynucléotides référencés dans le listing de séquence sous SEQ ID n°36 à 45.

Les banques ainsi obtenues sont formées d'ADN spécifiques des méningocoques et absents chez les gonocoques.

5 La spécificité des ADN a été vérifiée comme exposé dans les exemples, à chaque itération par Southern blots, avec des gènes communs à la souche de soustraction et à la souche de référence, ou avec l'ADN total de chacune des souches digéré par une endonucléase de restriction, telle que *ClaI*.

10 A chaque itération, a également été vérifiée l'exhaustivité de la banque d'ADN par Southern blotting avec des sondes connues pour être spécifiques de la souche de référence, à savoir pour *Neisseria meningitidis*, les gènes *frp*, *opc*, rotamase, notamment.

15 Les expériences réalisées ont montré que les banques obtenues selon le procédé de l'invention sont dépourvues des gènes présentant une homologie significative avec des espèces de *Neisseria* autre que *Neisseria meningitidis*, par exemple les gènes, *ppk* ou *pilC1*, et ce généralement, en seulement 2 ou 3 itérations.

20 Si nécessaire, deux voies, non exclusives l'une de l'autre, peuvent être empruntées.

Il est possible de procéder à une $(n+1)^{\text{ème}}$ itération, en utilisant l'ADN de l'itération n comme population d'ADN de la souche de référence.

25 En variante, on réalise une deuxième banque, indépendante de la première, avec une enzyme de restriction de spécificité différente de celle utilisée dans la première banque, par exemple *MboI*.

30 Dans tous les cas, il est préférable de conserver chacun des produits issus de chacune des itérations réalisées.

L'invention vise également l'utilisation de la technique soustractive décrite ci-dessus pour obtenir des

banques d'ADN communs entre Nm et Ng, mais spécifiques par rapport à Nl.

On constitue avantageusement trois banques différentes, dont deux par digestion de l'ADN chromosomique de Nm par *MboI* et *Tsp5091*, et la
5 troisième, par digestion de l'ADN chromosomique de Nm avec *MspI*. Deux séries de soustraction permettent de récupérer des ADN présentant la spécificité recherchée, comme décrit dans les exemples.

10 Le procédé d'obtention de ces banques et les banques elles-mêmes font également partie de l'invention.

On observera que, de manière générale, le procédé de l'invention est applicable pour l'obtention de banques d'ADN spécifiques d'une espèce de cellule donnée ou d'un
15 variant donné d'une même espèce, dès lors qu'il existe une autre espèce ou un autre variant proche génomiquement et exprimant des pouvoirs pathogènes différents.

En appliquant le procédé de l'invention, on constituera avantageusement des banques d'ADN spécifiques d'espèces données de cryptocoques, d'*Haemophilus*, de
20 pneumocoques ou encore d'*Escherichia coli*, ou plus généralement de tout agent bactérien appartenant à la même espèce et disposant de pathovars différents.

De même, à partir de ces banques, l'invention
25 fournit les moyens de disposer de facteurs de virulence spécifiques d'une espèce ou d'un variant donné.

De telles banques constituent donc des outils présentant un intérêt majeur pour disposer d'attributs responsables de la spécificité d'un pathogène, cette
30 application étant plus spécialement illustrée conformément à l'invention par l'obtention de banques renfermant les attributs responsables de la spécificité de la pathogénèse méningococcique.

L'étude des produits de l'invention, acides
35 nucléiques, polypeptides et anticorps, a permis de mettre

en évidence une spécificité absolue vis-à-vis de *Neisseria meningitidis*, quelle que soit la souche et sa variabilité.

5 Ces produits sont donc particulièrement appropriés pour le diagnostic ou la prévention des infections et méningites provoquées par *Neisseria meningitidis*, que ce soit chez l'adulte ou l'enfant et quel que soit le séro groupe de la souche en cause.

10 La méthode de diagnostic, selon l'invention, d'une infection meningococcique, et plus particulièrement de la méningite meningococcique, par mise en évidence de la présence de *Neisseria meningitidis* dans un échantillon à analyser, est caractérisé par les étapes de :

15 - mise en contact, d'un échantillon à analyser, à savoir un échantillon biologique ou une culture cellulaire, avec un réactif élaboré à partir d'au moins un acide nucléique tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de sonde nucléotidique ou d'amorce, ou en variante à partir d'au moins un anticorps, ou un
20 fragment d'anticorps, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant respectivement une hybridation ou une réaction de type antigène-anticorps, et
- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

25 Lorsque le réactif est élaboré à partir d'un acide nucléique, celui-ci peut se présenter sous forme de sonde nucléotidique dans laquelle l'acide nucléique, ou un fragment de ce dernier, est marqué afin de permettre sa révélation. Des marqueurs appropriés comprennent des
30 marqueurs radio-actifs, fluorescents, enzymatiques ou luminescents.

En variante, l'acide nucléique est inclus dans une cellule hôte, utilisée comme réactif.

Dans ces différentes formes, l'acide nucléique est utilisé tel quel ou sous forme d'une composition avec des véhicules inertes.

5 Lorsque le réactif est élaboré à partir d'un anticorps, ou d'un fragment d'anticorps, celui-ci peut être marqué aux fins de révélation. Le plus couramment, on utilise un marqueur fluorescent, enzymatique, radio-actif ou luminescent.

10 L'anticorps, ou le fragment d'anticorps utilisé, le cas échéant, marqué, peut être utilisé tel quel ou sous forme d'une composition avec des véhicules inertes.

L'échantillon utilisé dans l'étape de mise en contact est un échantillon biologique, issu d'un mammifère, tel que liquide céphalo-rachidien, urine, sang, salive.

15 L'étape de révélation est réalisée dans des conditions permettant de mettre en évidence le produit de réaction lorsqu'il s'est formé. Des moyens classiques mettent en oeuvre des réactions de fluorescence, luminescence, colorées, radio-actives ou encore des techniques d'autoradiographie. Il est également possible de quantifier le produit.

20 Les produits marqués, acides nucléiques et anticorps font également partie en tant que produits nouveaux de l'invention.

La méthode définie ci-dessus peut être appliquée au diagnostic d'une réaction immunitaire spécifique d'une infection méningococcique.

25 On utilise alors comme réactif un polypeptide conforme à l'invention, tel que codé par lesdites séquences d'acides nucléiques, correspondant au produit natif, ou un polypeptide modifié, mais possédant l'activité biologique et immunologique de polypeptide natif correspondant.

Il s'agit avantageusement d'un polypeptide tel qu'exporté au-delà de la membrane cytoplasmique de *Neisseria meningitidis*, plus particulièrement de la partie d'un tel polypeptide correspondant à la région conservée de l'ADN.

L'invention vise également des kits pour la mise en oeuvre des méthodes définies ci-dessus. Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils comportent :

- au moins un réactif tel que défini ci-dessus, à savoir de type acide nucléique, anticorps ou polypeptide,
- les produits, notamment marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction d'hybridation nucléotidique ou de la réaction immunologique visée, ainsi qu'une notice d'utilisation.

La spécificité des produits de l'invention et leur localisation sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* Z2491 soit regroupés en région, pouvant être interprétées comme des ilots de pathogénécité, soit isolés sur le chromosome, leur confèrent un intérêt tout particulier pour la réalisation de compositions vaccinales à visée universelle, c'est-à-dire quelque soit la souche et la variabilité qu'elle exprime. Ces compositions peuvent inclure dans leur spectre d'autres prophylaxies, et être, par exemple, associées aux vaccins de l'enfance.

L'invention vise donc des compositions vaccinales incluant dans leur spectre une prophylaxie à visée anti-méningococcique, destinées à prévenir toute infection susceptible d'être provoquée par *Neisseria meningitidis*, ces compositions étant caractérisées en ce qu'elles comprennent, en association avec un ou des véhicule(s) physiologiquement acceptable(s), une quantité efficace de polypeptides ou d'anti-anticorps ou de leurs fragments tels que définis ci-dessus, ces produits étant éventuellement conjugués, afin de renforcer leur immogénécité.

Des molécules immunogènes utilisables comprennent la protéine de polyovirus, la toxine tétanique, ou encore la protéine issue de la région hypervariable d'une piline.

En variante, les compositions vaccinales selon l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent, en association avec un/des véhicule(s) physiologiquement acceptable(s), une quantité efficace :

- d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus,
- de cellules hôtes transformées telles que définies plus haut, ou

- de cellules de Nm dont le chromosome a été délété d'au moins une séquence d'ADN selon l'invention impliquée dans la pathogénicité de la bactérie. Le matériel nucléotidique utilisé est avantageusement placé sous le contrôle d'un promoteur favorisant son expression in vivo et la synthèse de la protéine correspondante. Il est également possible afin de renforcer l'immunogénicité, d'associer ce matériel nucléique avec un ADN ou un ARN encodant une molécule porteuse telle que protéine de polyovirus, toxine tétanique, protéine issue de la région hypervariable d'une piline.

Les compositions vaccinales de l'invention sont administrables par voie parentérale, sous-cutanée, intramusculaire ou encore sous forme de spray.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent afin d'illustrer celle-ci sans toutefois en limiter sa portée.

Dans ces exemples, il sera fait référence aux figures 1 à 11 qui représentent respectivement

- les figures 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F et 1G l'analyse de la banque soustractive Tsp5091,
- la figure 2, la distribution de séquences Nm-spécifiques par rapport à Ng sur le chromosome de la

souche Z2491, (partie gauche) et de séquences Nm spécifiques par rapport à N1 (partie droite),

- la figure 3A à 3C, la réactivité des clones des 3 régions du chromosome, selon l'invention, envers une
5 panel de souches du genre *Neisseria*,

- la figure 4, la position, dans la région 2 du chromosome de Nm, d'oligonucléotides utilisés comme sondes,

- les figures 5, 6 et 7, les Southern blots d'un panel de
10 souches du genre *Neisseria*, en utilisant des parties de la région 2 de Nm comme sondes,

- les figures 8A à 8C, les Southern blots avec 3 banques soustractives sur un panel de 12 souches de *Neisseria*, et

- les figures 9, 10 et 11, la réactivité de clones des 3
15 banques soustractives vis-à-vis de Nm, N1 et Ng.

Dans les exemples qui vont suivre, les matériels et méthodes suivants ont été utilisés :

Souches bactériennes - Pour la réalisation des banques soustractives, on a utilisé la souche Z2491 de Nm
20 (Achtman et al., 1991, *J. Infect. Dis.* 164, 375-382) les souches MS11 (Swanson et al., 1974, *Infect. Immun.* 10, 633-644), et les souches 8064 et 9764 de N1, étant entendu que tout autre souche de l'espèce considérée pourrait être utilisée.

25 Afin de vérifier la spécificité de ces banques, 6 souches de Nm, 4 souches de Ng, une souche de N1 (*Neisseria lactamica*) et une souche de Nc (*Neisseria cinerea*) ont été utilisées.

Les six souches de Nm sont : Nm Z2491 de séro groupe
30 A, Nm 8013 de séro groupe C (XN collection), Nm 1121 non séro groupable (XN collection), Nm 1912 séro groupe A (XN collection), Nm7972 de séro groupe A (XN collection) et Nm 8216 de séro groupe B (XN collection).

Les quatre souches de Ng sont : Ng MS11 (Institut
35 Pasteur, Paris), Ng 403 (Institut Pasteur, Paris), Ng

6934 (Institut Pasteur, Paris), Ng WI (isolée à partir d'une infection gonococcique disséminée), Ng 4C1, Ng 6493 et Ng FA 1090.

Les souches de N1 sont N1 8064 et N1 9764 (XN collection) et celle de Nc, Nc 32165 (XN collection).

Techniques de génétique moléculaire

Sauf indication contraire, les techniques et réactifs utilisés correspondent à ceux recommandés par Sambrook et al (Sambrook et al 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Les oligodésoxynucléotides utilisés dans cette étude sont :

RBam12, 3'AGTGGCTCCTAG 54 (SEQ ID N°54)
15 RBam24, 5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3'; (SEQ ID N°55)
Jbam12, 3' GATCCGTTTCATG 5'; (SEQ ID N°60)
JBAM24, 5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3'; (SEQ ID N°61)
REco12, AGTGGCTCTTAA; (SEQ ID N°56)
REco24, 5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3'; (= RBam 24)
20 JEco12, GTACTTGCTTAA; (SEQ ID N°62)
JEco24, 5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3'; (= JBam24)
NEco12, AATTCTCCCTCG; (SEQ ID N°64)
NEco24, AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG; (SEQ ID N°65).

25 Transferts sur membranes (Southern blots)

Les transferts sur membranes ont été réalisés par transferts capillaires sur des membranes en nylon chargées positivement (Boehringer Mannheim). Les hybridations ont été réalisées à 65°C dans une solution
30 comprenant NaPi 0,5M pH7,2/EDTA 1mM/SDS 7%/ BSA 1%. Les lavages des membranes ont été réalisées dans une solution comprenant NaPi 40mM pH7,2/EDTA 1mM/SDS 1%. Le lavage final a été réalisé à 65°C pendant 5 min.

La sonde *frp*, obtenue avec des oligonucléotides
35 basés sur la séquence de *frpA* correspond à 2,4 kb de

l'extrémité 5' du gène de la souche Z2491. Les sondes *opc* et *rotamase* correspondant aux gènes entiers sont produites à partir de la souche Z2491 en utilisant des oligonucléotides réalisés sur la base de séquences publiées. Les sondes *pilC1* et *ppk* (polyphosphate kinase) correspondent aux inserts des plasmides *pJL1* et *pBluePPK6001*, respectivement.

Exemple 1 : Réalisation de banques d'ADN présents chez Nm et absents chez Ng.

a. Banque "MboI"

Réalisation - L'ADN de Nm Z2491 a été clivé par l'endonucléase *MboI* et soumis à deux itérations d'une méthode, appelée ci-après CDA (Comprehensive Difference Analysis). Cette méthode comprend une hybridation soustractive en présence d'un excès d'ADN cisailé de Ng MS11 et une amplification par PCR de celles des séquences méningococciques qui, étant absentes de ou ne présentant pas d'homologie significative avec l'ADN de Ng MS11, pouvaient se ré-anneler.

L'ADN chromosomique de la souche Ng MS11 est cisailé de manière aléatoire par passages répétés à travers une seringue hypodermique jusqu'à obtention de fragments dont la taille s'échelonne de 3 à 10 kb. Ces fragments d'ADN sont purifiés par extraction phénolique.

L'ADN chromosomique de la souche Nm Z2491 est, quant à lui, clivé par l'endonucléase de restriction *MboI*. Ces fragments d'ADN (20 µg) sont ligaturés à 10 nmoles des oligonucléotides annelés *RBam12* et *RBam24*. Les amorces en excès sont éliminées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% à bas point de fusion. La partie du gel contenant des fragments amplifiés de taille supérieure à 200 pb est excisée et digérée par la β -agarase. Ces fragments sont purifiés par extraction phénolique.

Afin de réaliser une hybridation soustractive (première itération), 0,2 µg d'ADN Nm, ligaturé aux oligonucléotides RBam, est mélangé à 40 µg d'ADN Ng dans un volume total de 8 ml d'un tampon EE 3X (un tampon EE 1X est composé de N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(acide
5 sulphonique propane 3) 10 mM et d'EDTA 1 mM, son pH est de 8.0). Cette solution est recouverte d'huile minérale et l'ADN est dénaturé par chauffage à 100°C pendant 2 min. 2 µl de NaCl 5M sont ajoutés et on laisse le mélange
10 s'hybrider à 55°C pendant 48h. Le mélange réactionnel est dilué à 1/10 dans une solution préchauffée composée de NaCl et de tampon EE, puis immédiatement placé sur de la glace.

10 µl de cette dilution sont ajoutés à 400 µl de
15 mélange réactionnel pour PCR (Tris.HCl pH9.0 10mM; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Triton X100 0,1 %; 0,25 mM de chacun des quatre désoxynucléotides triphosphate ; Taq polymérase 50 unités par ml). Le mélange est incubé pendant 3 min à 70°C pour compléter les extrémités des
20 fragments ré-annelés d'ADN méningococciques.

Après dénaturation à 94°C pendant 5 min et addition de l'oligonucléotide RBam24 à raison de 0,1 nmole par 100 µl, les hybridations sont amplifiées par PCR (30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 70°C et 3 min à 72°C suivis par
25 1 min à 94°C et 10 min à 72°C; Perkin-Elmer GeneAmp 9600).

Les fragments méningococciques amplifiés sont séparés sur gel des amorces et des ADN gonococciques de hauts poids moléculaires. Ils sont digérés par MboI et de
30 nouveaux oligonucléotides JBam12 et JBam24 leur sont ligaturés. Ces ADN ligaturés sont à nouveau purifiés sur gel et extraits au phénol.

Une seconde itération d'hybridation soustractive est réalisée sur 40 µg d'ADN Ng cisailé de manière aléatoire
35 et 25 ng d'ADN ligaturé aux oligonucléotides JBam tel

qu'obtenu à l'issue de la première itération d'hybridation soustractive. Lors de cette seconde itération, l'amplification de l'ADN Nm auto-annelé est réalisée à l'aide de l'oligonucléotide Jbam24.

5 Spécificité - Afin de confirmer leur Nm-spécificité, les séquences amplifiées après la seconde itération de la méthode CDA sont marquées et utilisées comme sonde pour de l'ADN digéré par *ClaI* issu d'un panel de six souches de *Neisseria meningitidis*, quatre de
10 *Neisseria gonorrhoeae*, une de *Neisseria lactamica* et une de *Neisseria cinerea*.

Les Southern blots réalisés montrent que les séquences amplifiées à l'issue de la seconde itération de la méthode CDA présentent une forte réactivité avec de
15 nombreuses bandes correspondant aux meningocoques et ne présentent pas de réactivité avec les bandes correspondant aux souches Ng, Nl, Nc.

La banque "MboI" apparaît donc comme Nm-spécifique.

20 Exhaustivité - Afin de tester l'exhaustivité de la banque, l'ensemble des produits issus de la première et de la seconde itérations de la méthode CDA ainsi que les matériaux chromosomiques initiaux de Nm 22481 et de Ng MS11 sont soumis à électrophorèse sur gel d'agarose, transférés sur membrane et mis en contact avec des sondes
25 comprenant des gènes connus pour être méningococcus-spécifiques, à savoir *frp*, *opc*, rotamase (Southern blot).

Il résulte de ces hybridations que le gène Nm-spécifique *frp* est représenté dans la banque MboI par un fragment de 600 pb, mais qu'aucune activité n'est
30 observée pour les gènes rotamase et *opc*. La banque MboI, bien que Nm-spécifique, ne peut donc être considérée comme exhaustive.

Etant donné leur haute spécificité, les fragments issus de la seconde itération de la méthode CDA pour la

banque *MboI* peuvent néanmoins être clonés sur le site *BamHI* du plasmide *pBluescript*.

Une séquence correspondant à un quelconque des gènes *Nm*-spécifiques ne peut être incluse dans la banque soustractive que si elle est portée par un fragment de restriction de taille appropriée. Cette condition est fonction de deux facteurs. Premièrement, la probabilité pour que les plus grands fragments soient entièrement *Nm*-spécifiques est faible. Deuxièmement, même si de tels fragments existaient, ils seraient sous-représentés dans la banque du fait des limitations de la technique PCR dont l'efficacité d'amplification diminue avec l'augmentation de la taille des fragments. Les fragments de taille supérieure à environ 600 pb ne sont pas inclus dans la banque. Du fait de l'absence, dans le chromosome de *Nm* Z2491, de fragments *Mbo* de taille appropriée, les gènes *rotamase* et *opc* ne peuvent être inclus dans la banque. Une enzyme quelconque ne peut à elle seule produire un petit fragment correspondant à un gène *Nm*-spécifique quelconque. Une deuxième banque a donc été réalisée en utilisant une autre enzyme de restriction avec une spécificité différente : *Tsp509*.

b. Banque "*Tsp509I*"

Réalisation - L'enzyme *Tsp509I* présente l'avantage de produire des fragments de plus petite taille (inférieure à 1 kb environ) que l'enzyme *MboI*.

Tsp509I reconnaît la séquence AATT et laisse, en saillie en 5', une séquence de 4 bases compatible avec *EcoRI*. Les oligonucléotides utilisés sont Reco, Jeco et NEco.

La méthode suivie est conforme à celle suivie pour la réalisation de la banque "*MboI*" décrite ci-dessus. De plus fortes quantités d'ADN méningococciques ont cependant été utilisées pour la première itération

d'hybridation soustractive afin de compenser le plus grand nombre de fragments de faibles poids moléculaires produits par Tsp509I. Pour la première itération, 400 ng de fragments d'ADN Nm et, dans la seconde, 25 ng de fragments Nm sont soumis à hybridation soustractive avec 40 µg d'ADN Ng cisailé de manière aléatoire.

Pour la réalisation de cette banque "Tsp509I", à titre de contrôle, une troisième itération d'hybridation soustractive est réalisée en utilisant 40 µg d'ADN Ng cisailé et 0,2 ng de fragments Nm résultant d'une digestion par Tsp509I et d'une re-ligature aux adaptateurs NEco des fragments obtenus à l'issue de la seconde itération.

Spécificité - Comme décrit pour la banque précédente, le produit issu de la deuxième itération de la méthode CDA est marqué et utilisé comme sonde pour un panel de souches de *Neisseria*.

La figure 1A illustre l'hybridation Southern blot des produits de la seconde itération de la méthode CDA avec l'ADN digéré par ClaI de : Nm en piste a, de Ng MS11 en piste b, de Nm 8013 en piste c, de Ng 403 en piste d, de Nm 1121 en piste e, de Ng 6934 en piste f, de Nm 1912 en piste g, de Ng WI (souche DGI) en piste h, de Nm 7972 en piste i, de N1 8064 en piste j, de Nc 32165 en piste k, de Nm 8216 en piste l.

Contrairement à la forte réactivité observée avec toutes les souches Nm, une faible, ou aucune réactivité, est observée avec les souches Ng, N1 et Nc.

La spécificité de la banque a été étudiée plus avant en faisant réagir des transferts sur membrane (Southern blots) des produits issus de chacune des trois itérations de la méthode CDA avec des sondes correspondant à *pilC1* et *ppk*. Ces deux gènes sont communs à Nm et Ng.

La figure 1B représente un gel d'agarose après électrophorèse des chromosomes de Nm 22491 et Ng MS11,

digérés avec *Tsp509* et des produits issus de chacune des itérations de la méthode CDA.

En piste a, a été déposé 1 µg du chromosome de Nm, en piste b 1 µg de celui de Ng, en piste c 0,15 µg des produits issus de la première itération CDA, en piste d 0,1 µg de ceux de la seconde itération, en piste e 0,05 µg de la troisième itération, MW représentant les marqueurs de taille moléculaire.

Les figures 1C et 1D représentent des gels réalisés comme décrits en figure 1B après transfert sur membrane (Southern blots) et hybridation avec *pilC1* (figure 1C) et *ppk* (figure 1D).

A l'issue de la seconde itération de la méthode CDA, les séquences correspondant aux gènes *pilC1* et *ppk* sont complètement exclues de la banque.

Exhaustivité - L'exhaustivité de la banque a été examinée en faisant réagir les produits issus de l'hybridation soustractive avec des sondes correspondant à trois gènes Nm-spécifiques (*frp*, rotamase et *opc*).

Ces sondes Nm-spécifiques réagissent avec les produits d'amplification issus de la première et de la seconde itération d'hybridation soustractive.

Les figures 1E, 1F et 1G représentent des gels réalisés comme décrits en figure 1B après transfert sur membrane (Southern blots) et hybridation avec *frpA* (figure 1E), rotamase (figure 1F) et *opc* (figure 1G).

Une troisième itération d'hybridation soustractive conduit cependant à la perte de séquences Nm-spécifiques car les fragments réagissant avec les gènes rotamase et *opc* sont absents de cette troisième itération.

En considérant l'ensemble de ces données, il résulte que les produits issus de la seconde itération de la méthode CDA sont Nm-spécifiques et constituent également une banque exhaustive des séquences Nm-spécifiques.

Les produits issus de cette deuxième itération sont clonés au niveau du site *EcoRI* du plasmide pBluescript.

La banque produite par *Tsp509I* est plus exhaustive que la banque produite par *MboI*, comme les
5 considérations théoriques basées sur la production enzymatique de plus petits fragments de restriction le supposaient.

Selon cet aspect, il faut aussi noter que la banque
10 *Tsp509I* est moins redondante que la banque *MboI* c'est-à-dire qu'elle comprend moins de duplication de clones. 86% des clones de la banque *Tsp509I* correspondent à des séquences distinctes alors que seulement 43% des clones correspondent à des séquences distinctes dans la banque *MboI* (données non présentées).

15 La banque produite par *Tsp509I* constitue donc une source de clones Nm-spécifiques.

Exemple 2 : Analyse des clones des banques soustractives

20 Clonage et séquençage des ADN Nm-spécifiques

Les ADN des banques soustractives sont clonés au niveau du site *BamHI* (banque *MboI*) ou *EcoRI* (banque *Tsp509I*) du plasmide pBluescript, puis transformés dans
25 DH5 α de *E. coli*. Les inserts sont amplifiés par PCR réalisée sur les colonies transformées en utilisant les amorces M13-50 et M13-40, cette dernière amorce étant biotinylée à son extrémité 5'.

Le séquençage a été réalisé sur chaque produit PCR après séparation des brins biotinylés et non-biotinylés
30 en utilisant le système Dynabeads M-280 à streptavidine (Dynal, Oslo). Les séquences sont criblées selon leurs homologues avec des séquences précédemment publiées en utilisant les programmes informatiques Blastn et Blastx (NCBI, USA et Fasta).

Les produits PCR issus des colonies de bactéries transformées, après utilisation des amorces M13-40 et M13-50 comme décrit ci-dessus, ont été marqués par incorporation avec amorçage aléatoire de α -³²P-dCTP et ont été utilisés comme sonde pour les transferts sur membrane de l'ADN chromosomique digéré par ClaI des souches Nm Z2491 et Ng MS11, comme décrit ci-dessus afin de vérifier leur spécificité.

10 **Cartographie des clones sur le chromosome de la souche Nm Z2491.**

On rapporte les résultats des études effectuées avec 17 clones de la banque "MboI" (désignés par la lettre B) et 16 clones de la banque "Tsp5091" (désignés par la lettre E), chacun de ces clones présentant une séquence unique et sans contrepartie chez Ng.

Les positions des séquences d'ADN correspondant aux produits Nm-spécifiques clonés ont été déterminées par rapport à la carte publiée du chromosome de Nm Z2491 (Dempsey et al. 1995, J. Bacteriol. 177, 6390-6400) et à l'aide de transferts sur membranes (Southern blots) de gels d'agarose ayant été soumis à électrophorèse à champ pulsé (PFGE).

Les clones Nm-spécifiques sont utilisés comme sondes pour une hybridation sur membranes (Southern blots) de l'ADN de Nm Z2491 digéré avec des enzymes à rares sites de coupure, à savoir PacI, PmeI, SgfI, BglII, SpeI NheI que SgfI.

Les gels (20 x 20 cm) étaient des gels à 1% d'agarose dans un tampon TBE 0,5X et ont été soumis à électrophorèse à 6 V/cm pendant 36 heures selon des périodes de pulsation variant de manière linéaire entre 5 et 35 secondes.

Les hybridations sur membrane (Southern blots) ont été réalisés comme décrit précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 2 : la réactivité a été localisée par comparaison avec les positions des fragments de taille correspondante sur la carte publiée. Les positions de l'ensemble des marqueurs génétiques cartographiés par Dempsey et al (précédemment cité) sont visualisées à l'aide de points sur la carte linéaire chromosomique. Les gènes Nm-spécifiques précédemment divulgués sont marqués d'un astérisque. Les deux loci appelés "*frp*" correspondent aux gènes *frpA* et *frpC*. Les locis "*pilC*" correspondent aux gènes *pilC1* et *pilC2* qui sont des paires de gènes homologues et qui ne sont pas distingués sur la carte. La précision des positions des clones Nm-spécifiques de l'invention dépend des chevauchements des fragments de restriction réactifs. En moyenne, la position est de +/- 20 kb.

Cette cartographie révèle une distribution non aléatoire des séquences Nm-spécifiques. La majorité des séquences Nm-spécifiques appartiennent à trois groupes distincts. Un de ces groupes (région 1) correspond à la position de gènes relatifs à la capsule précédemment décrits.

On distingue :

- E109, E138, B230 et B323 comme étant la région 1,
- B322, B220, B108, B132, B233, B328, E139, E145 et B101 comme étant la région 2, et
- B306, E114, E115, E124, E146, E120, E107, E137 et E142 comme étant la région 3.

63% des séquences identifiées comme spécifiques des méningocoques sont localisées à l'intérieur de ces trois régions distinctes.

Ce regroupement contraste avec la distribution de gènes Nm-spécifiques précédemment divulgués (*frpA*, *frpC*, *porA*, *opc* et la région relative à la capsule).

Cet art antérieur suggérait en effet que les gènes Nm-spécifiques étaient à l'exception des gènes fonctionnellement relatifs à la capsule, dispersés le long du chromosome.

5 La cartographie des séquences Nm-spécifiques sur le chromosome conduit à un résultat inattendu en regard de l'art antérieur.

La majorité des différences génétiques entre les souches meningococcale et gonococcale testées sont
10 regroupées en trois régions distinctes.

La région 1 regroupe des gènes relatifs à la capsule des meningococci.

La fonction des gènes des autres régions n'est pas connue mais des homologies avec des séquences publiées
15 (tableau 1) suggèrent des similarités entre certains gènes de la région 3 et les protéines transposases et de régulation de bactériophages. Aucun virus meningococcal n'a été caractérisé et il est tentant d'imaginer que ces séquences soient d'origine phagique. De manière
20 intéressante, le génome de *H. influenzae* contient également une séquence homologue à celle de la protéine de régulation Ner du phage Mu mais on ne sait pas s'il s'agit d'un gène fonctionnel.

Le clone B208 présente une forte homologie (48%
25 d'identité, 91% d'homologie pour 33 acides aminés) avec un clone des régions conservées (domaine III) dans la classe des protéines qui se lient aux sidérophores ferriques TonB-dépendants.

La proximité de ce clone avec les gènes Nm-spécifiques *porA* et les gènes régulés par le fer *frp*, et
30 en particulier la possibilité qu'il s'agisse d'une protéine récepteur Nm-spécifique exposée sur la membrane externe font de lui un bon candidat pour de plus amples recherches.

Le clone B339 correspond à la séquence d'insertion Nm-spécifique IS1106.

La faible homologie entre le clone B134 et la séquence d'insertion d'*Aeromonas*, ainsi que la présence
5 en copies multiples du clone B134 parmi des souches variées de Nm, suggèrent qu'il pourrait représenter un nouveau type de séquence d'insertion Nm-spécifique.

La possibilité pour que les régions contenant les clones Nm-spécifiques puissent correspondre à des îlots
10 de pathogénicité comme précédemment décrit pour *E. coli* et *Y. pestis* est d'un intérêt particulier.

Les clones isolés dans cette invention vont permettre de mieux comprendre la pertinence des régions Nm-spécifiques en permettant le clonage et le séquençage
15 de fragments chromosomiques plus grands et directement par leur utilisation pour des mutations de loci.

Enfin, la détection des gènes meningococcus-spécifiques, éventuellement impliqués dans la pathogénicité de l'organisme, permet de cibler des
20 antigènes appropriés utilisables dans un vaccin anti-meningococcique.

L'efficacité et la rapidité de la méthode selon l'invention permettent son utilisation dans un grand nombre de situations pour lesquelles les différences
25 génétiques responsables d'un phénotype particulier à un de 2 pathogènes proches sont recherchées.

Etude de la réactivité des clones des régions 1, 2 et 3 vis-à-vis d'un panel de souches de *Neisseria*

30 Les produits PCR correspondant aux inserts de chacun des clones ont été rassemblés et utilisés comme sondes d'hybridation sur membranes (Southern blots) pour un panel de souches de Nm, de Ng, de N1 et de Nc.

Les régions 1 et 2 produisent un nombre limité de
35 bandes pour chacun des méningocoques. Cela suggère que

ces régions sont à la fois Nm-spécifiques et communes à tous les méningocoques.

La figure 3 illustre la réactivité des clones des régions 1, 2 et 3 envers un panel de souches neisseriales. Les clones des régions 1 (figure 3A), 2 (figure 3B) et 3 (figure 3C) pris ensemble ont été utilisés comme sondes envers un panel de meningococci, gonococci et envers une souche de N1 et de Nc.

Les pistes sont les suivantes : ADN de Nm Z2491 en piste a, de Ng MS11 en piste b, de Nm 8013, en piste c, de Ng 403 en piste d, de Nm 1121 en piste e, de Ng 6934 en piste f, de Nm 1912 en piste g, de Ng WI (souche DGI) en piste h, de Nm 7972 en piste i, de N1 8064 en piste j, de Nc 32165 en piste k, de Nm 8216 en piste l.

De manière remarquable, la région 3 ne présente de réactivité qu'avec les meningococci de séro groupe A. Cette région 3 est donc spécifique d'un sous-groupe de Nm.

Une comparaison avec des séquences connues dans les banques de données a été réalisée afin d'évaluer les possibles fonctions des régions clonées.

Le tableau 1 qui suit donne les positions des clones spécifiques sur la carte chromosomique et les homologies avec des séquences connues.

TABLEAU 1 - Position des clones spécifiques sur la carte chromosomique et homologues avec des séquences communes

Nom du Clone*	Taille de l'insert	Fragments réactifs					Sgf	Position sur Z2491	Homologies des séquences protéiques
		Pac	Pme	Bgl	Spe	Nhe			
B305	259	18-20	15-17	22-23	18	11-13	2	λ 736	
B333	235		15-17	22-23	18	11-13	2	λ 736	
E109 ¹⁺	211		6-7	11-15	10	11-13	2	<i>mfaA</i> <i>ctrA</i>	protéine LipB <i>N. meningitidis</i> (3 x 10 ⁻³⁶)
E138 ¹⁺	315	1	6-7	11-15	10	11-13	2	<i>mfaA</i> <i>ctrA</i>	protéine LipB <i>N. meningitidis</i> (4 x 10 ⁻³⁵)
B230 ¹	356	1-3	6-7	1	10	11-13	2	<i>ctrA</i>	protéine KpsC <i>E. coli</i> (3 x 10 ⁻⁵⁵)
B323 ¹	363	1	6-7	1	10	11-13	2	<i>ctrA</i>	protéine CtrB <i>N. meningitidis</i> (2 x 10 ⁻⁶⁴)
B322 ²	210		2	16-18	6	1	5	<i>pilQ</i> / λ 740	HK-B <i>S. marcescens</i> (4 x 10 ⁻¹⁵)
B220 ²	341		2	16-18	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
B108 ²	275		2	19-21	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
B132 ²	411	2	2	19-21	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
B233 ²	164	1-3	2	19-21	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
B328 ²	256	1-3	2	22-23	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
E139 ²	324	2	2	19-21	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
E145 ²	343	2	2	19-21	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
B101 ²	254	≥ 20	2	19-21	6	≥ 18	5	<i>pilQ</i> / λ 740	
E103q	334		2	11-15	3-5	10	3	λ 644	
B326 ³	314		2	11-15	3-4	10	3	λ 644	
B326 (faible réactivité)			5	6	16	2	1	<i>wgf</i>	
B342	167		2	19	3-4	6-7	3	<i>iga</i>	
E136	249		2	7	1	3	3	<i>lepA</i>	

B208	177		1	2	3-4	2	1	parA	Récepteur de la pyochéline FeIII <i>P. aeruginosa</i> (5×10^{-7})
= B306 ^{3a}	219	11	5	11-12	5	2	4	parC	
E114 ³	227	11	5	11-12	5	2	4	parC	
E115 ^{3a}	251		5	11-15	5	2	4	parC	
E124 ³	208		5	11-12	5	2	4	parC	
E146 ³	146		5	11-15	5		4	parC	
E120 ³	263		5	3-4	5	16	4	opaB	
E107 ³	248	11	14-17	3-4	5	16	4	opaB	
E137 ³	274		14-17	3-4	5	16	4	opaB	Transposase Bacteriophage D3112 (6×10^{-12})
E142 ³	230		14-17	3-4	5	16	4	opaB	Protéine Ner-Like <i>H. influenzae</i> (6×10^{-23}) Protéine se liant à l'ADN Ner. Phage mu (3×10^{-16})
E116	379	5-7	11-13	3-4	2	6-7	8	λ 375	
B313	436	9	9	3-4	13-14	5	2	λ 611	
B341	201	8-10	9	3-4	13-14	5	2	λ 611	
E102	238		11-13	3-4	19	5	2	λ 601	Protéine hypothétique H11730 <i>H. influenzae</i> (7×10^{-24}) transposase IS452, <i>Aeromonas salmonicida</i> (5×10^{-5}) transposase IS 1106 <i>N. meningitidis</i> (6×10^{-15})
B134	428			multiple					
B339	259			multiple					

Entre Parenthèses figure la signification des homologues trouvées, telle que donnée par le programme Blastx

a) Les clones marqués de l'exposant "1", "2" ou "3" appartiennent aux régions "1", "2" ou "3" respectivement du chromosome de *N. meningitidis* Z2491.

+) E109 et E138 sont des clones contigus §) B306 et E115 se chevauchent §) B236 présente également une faible réactivité dans la région de arg F

q) Le clone E103 contient un site *Typ509* I et peut donc contenir deux inserts, cependant, comme il ne réagit qu'avec un seul fragment (*lal* (Oks) du chromosome de *N. meningitidis* Z2491) et n'occupe qu'une position sur la carte, ce clone est inclus ici.

On peut voir, tout d'abord, que les clones de la région 1 correspondent tous aux gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule. Ces gènes ont été précédemment étudiés parmi les Nm de séro groupe B (Frosch et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1669-1673 et Frosch et Muller 1993, Mol. Microbiol. 8 483-493).

A l'exception d'une faible homologie avec l'activateur de hémolysine de *Serratia marcescens*, les clones de la région 2 ne présentent aucune homologie significative avec les séquences publiées, que ce soit au niveau de l'ADN ou des protéines.

Deux des clones de la région 3 présentent d'intéressantes homologies avec des protéines qui se lient à l'ADN, en particulier les protéines de régulation et les protéines transposases de bacteriophages.

Le clone B208 présente une forte homologie avec une des régions conservées dans une classe de récepteurs (sidérophore ferrique TonB-dépendant).

Les clones B134 et B339 s'hybrident avec de nombreuses régions du chromosome (au moins 5 et au moins 8, respectivement).

Les données concernant les séquences montrent que le clone B339 correspond à la séquence d'insertion Nm-spécifique S1106.

La traduction du clone B143 présente une homologie limitée avec la transposase d'une séquence d'insertion *Aeromonas* (SAS2) (Gustafson et al. 1994, J. Mol. Biol. 237, 452-463). Nous avons pu démontrer par transfert sur membrane (Southern blots) que ce clone est une entité Nm-spécifique présente en multiples copies dans les chromosomes de chaque meningo coque du panel testé.

Les autres clones ne présentent pas d'homologie significative avec les séquences neisseriales publiées ni d'ailleurs avec aucune séquence publiée. Ces clones constituent donc, avec la majorité des autres clones

isolés, une banque de loci Nm-spécifiques totalement nouveaux.

Exemple 3: Etude de la région 2 du chromosome de Nm

5

. Détermination et caractérisation de la séquence de la région 2

On procède à une amplification par PCR avec de l'ADN chromosomique de la souche Z2491 de séro groupe A, sous-
10 groupe IV-1, en utilisant des amorces d'oligonucléotides élaborées à partir de chacune des séquences de clones de la région 2, selon de nombreuses combinaisons différentes. On séquence les produits de la PCR qui se chevauchent à partir des 2 brins en utilisant la
15 technique de terminaison de chaîne et le séquençage automatisé (ABI 373 ou 377).

Pour prolonger la séquence au-delà des limites des clones disponibles, on clone des fragments partiels SauIIIA de 15 kb, de la souche Z2491, dans Lambda DASH-
20 II (Stratagène).

On identifie les phages contenant les inserts chevauchant la région 2 par hybridation avec comme sondes des clones de cette région. L'ADN inséré est séquencé à partir des extrémités des inserts et ces séquences sont
25 utilisées pour élaborer de nouvelles amorces qui serviront à amplifier directement l'ADN chromosomique et non l'ADN phagique.

On obtient une amplification de l'ADN chromosomique en utilisant ces nouvelles amorces et celles de la
30 séquence précédemment disponible.

Ces produits PCR sont également séquencés à partir des 2 brins, ce qui conduit à une séquence complète de 15620 pb (SEQ ID N°36). On analyse les cadres de lecture de cette séquence qui commencent par ATG ou GTG et qui
35 sont caractérisés par un indice d'usage de codons élevés.

Cette analyse révèle 7 COLs de ce type qui remplissent la plus grande partie de la séquence de 15620pb. Les positions de ces COLs sont les suivantes:

COL-1: 1330 à 2970 (SEQ ID N°37); COL-2: 3083 à 9025 (SEQ ID N°38); COL-3: 9044 à 9472 (SEQ ID N°39); COL-4: 10127 à 12118 (SEQ ID N°40); COL-5: 12118 à 12603 (SEQ ID N°41); COL-6: 12794 à 13063 (SEQ ID N°43); COL-7: 13297 à 14235 (SEQ ID N°44); et COL-8: 14241 à 15173 (SEQ ID N°45).

Le COL-4 commence avec le codon GTG et chevauche un COL légèrement plus petit (SEQ ID N°41) dans le même cadre de lecture (9620-12118, cadre 2) et qui commence par le codon ATG.

COL-4 code pour une protéine qui présente des homologies structurales avec une famille de polypeptides comprenant les pyocines (*Pseudomonas aeruginosa*), collicines et intimines (*Escherichia coli*) qui sont des toxines bactéricides (pyocines, collicines) ou des protéines de surfaces impliquées dans l'adhésion des bactéries aux protéines eucaryotes. Le COL-7 encode une protéine dont la séquence contient une région potentiellement transmembranaire, et qui présente des homologies structurales avec des protéines périplasmiques ou insérées dans la membrane externe des bactéries. Les homologies structurales de COL-4 et COL-7 ont été identifiées à l'aide du programme PropSearch.

La recherche de séquences homologues aux autres COL dans GenBank à l'aide du programme BLAST a révélé une homologie entre les régions N-terminales de COL-2 et l'hémagglutinine filamenteuse B de *Bordetella pertussis* (43% de similarité, 36% d'identité sur 352 acides aminés) et entre COL-1 et la protéine fhaC de *Bordetella pertussis* (35% de similarité, 27% d'identité sur 401 acides aminés). COL-1 et COL-2 sont des gènes voisins dans la souche Z2491 et l'hémagglutinine filamenteuse B de *Bordetella pertussis* et fhaC sont des gènes voisins dans *Bordetella pertussis*, ce qui renforce la probabilité que ces homologies reflètent des homologies fonctionnelles.

Confirmation de la spécificité de la région 2 vis-à-vis de Nm

On effectue des Southern blots en utilisant des sondes d'ADN obtenues par amplification par PCR de différentes parties de la région 2 en utilisant des amorces oligonucléotidiques élaborées à partir de séquences de clones de la région 2.

On a représenté sur la figure 4 la position approximative de ces oligonucléotides.

Il s'agit, dans une moitié de COL-1, des oligonucléotides appelés R2001 (SEQ ID N°46) et R2002 (SEQ ID N°47), dans une moitié de COL-1+la majeure partie de COL-2, des oligonucléotides b332a (SEQ ID N°48), e139a (SEQ ID N°49), b132a (SEQ ID N°50) et b233b (SEQ ID N°51), et dans 1/3 de COL-4+ COL-5 à 7, des oligonucléotides e145a (SEQ ID N°52) et b101a (SEQ ID N°53).

Les trois Southern sont réalisés dans les conditions d'hybridation suivantes:

16 h à 65°C,

NaPO₄ 0,5M, pH 7,2

EDTA-Na 0,001M

1% de dodécylsulfate de sodium.

Pour le lavage, on chauffe 10 min à 65°C et on utilise NaPO₄ 0,5M, pH 7,2; EDTA-Na 0,001M, 1% de dodécylsulfate de sodium.

Les figures 5, 6 et 7 représentent respectivement les Southern blots obtenus avec chacune des parties de COL mentionnées plus haut.

Les 14 pistes correspondent respectivement, dans chacun des Southern, à

1: MS11 (Ng)

25 2: 403 (Ng)

3: FA1090 (Ng)

4: W1 (Ng)

5: 6493 (Ng)

6: marqueur (lambda hindIII)

30 7: Z2491 (Nm, gpA)

8: 7972 (Nm gpA)

9: 8013 (Nm, gpC)

10: 1121 (Nm non groupable)

11: 1912 (Nm, gpB)

35 13: 32165 (Nc)

14: 8064 (N1).

Etant donné qu' un panel de souches de *Neisseria* est utilisé dans ces expériences et que chaque puits est chargé avec une quantité similaire d'ADN digéré, ces 3 Southern blots montrent clairement que les séquences correspondant à la région 2 sont trouvées dans tous les méningocoques testés et qu'il n'existe pas dans le génome de Ng des souches testées de séquences homologues significatives.

Exemple 4: Identification de régions du génome de Nm absentes de N1 et communes avec Ng

On opère selon la technique décrite dans l'exemple 1, mais on utilise l'ADN chromosomique d'une souche de Nm (Z2491) et de 2 souches de N1 (collection XN) dont on mélange les ADN à parts égales.

On effectue 2 soustractions en utilisant les séries d'amorces R et J. Trois banques différentes sont ainsi réalisées.

Deux banques, appelées Bam et Eco, sont respectivement obtenues par digestion de l'ADN chromosomique de Nm Z2491 par *MboI* et *Tsp5091*; une troisième banque, appelée Cla, qui résulte de la digestion de l'ADN chromosomique de Nm par *MspI*, est obtenue en utilisant le jeu d'amorces RMsp10, RMsp24, JMsp10 et JMsp24. L'ensemble des amorces utilisées est donné dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2

5 Adaptateurs pour banques différentielles

10 ADN chromosomique digéré par Clonage dans
pBluescript par

MboI → BamHI
Tsp509I → EcoRI
15 MspI → ClaI

20 Premier tour de soustraction

RBam12 : 3' AGTGGCTCCTAG 5' (SEQ ID N°54)
RBam24 : 5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3' (SEQ ID N°55)

25 REco12 : AGTGGCTCTTAA (SEQ ID N°56)
RBam24 : 5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3' (SEQ ID N°55)
(REco 24 = RBam 24)

30 RMsp10 : AGTGGCTGGC (SEQ ID N°57)
RMsp24 : 5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAC 3' (SEQ ID N°58)

Deuxième tour de soustraction

35 Jbam12 : 3' GTACTTGCCTAG 5' (SEQ ID N°59)
JBam24 : 5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3' (SEQ ID N°60)

40 JEco12 : GTACTTGCTTAA (SEQ ID N°61)
JBam24 : 5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3' (SEQ ID N°60)
(JEco 24 = JBam 24)

45 JMsp10 : GTACTTGGGC (SEQ ID N°62)
JMsp24 : 5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACC 3' (SEQ ID N°63)

Après 2 soustractions, on marque la totalité du produit de chaque amplification et on l'utilise comme sonde.

5 On effectue un contrôle des banques soustractives par Southern blot sur un panel de 12 souches de *Neisseria* (ADN chromosomique coupé par *ClaI*). Les conditions d'hybridation sont identiques à celles données dans l'exemple 1.

10 Ces Southern blots sont donnés sur les figures 8A à 8C, qui sont respectivement relatives à la banque *MboI/BamHI*, à la banque *MspI/ClaI* et à la banque *Tsp5091/EcoRI*.

Les 12 pistes correspondent respectivement à :

- 15 1: Nm 22491 (groupe A)
2: N1 8064
3: Nm 8216 (groupe B)
4: N1 9764
5: Nm 8013 (groupe C)
20 6: Ng MS11
7: Nm 1912 (groupe A)
8: Ng 4C1
9: Nm 1121 (non groupable)
10: Ng FA1090
25 11: Nc 32165
12: Nm 7972 (groupe A).

L'examen des Southern blots montre que les séquences contenues dans chaque banque sont spécifiques de Nm et ne
30 sont pas trouvées chez N1. De plus, la réactivité observée avec les souches de Ng suggère que certaines de ces séquences sont présentes chez Ng.

Chacune de ces banques a ensuite été clonée dans pBluescript au site *BamHI* pour Bam, ou *EcoRI* pour Eco, ou
35 *ClaI* pour Cla. Afin de confirmer la spécificité des

clones vis-à-vis du génome de Nm, on a procédé à une restriction des clones individuels et à leur radiomarquage. Les clones montrant à la fois une réactivité pour Nm et Ng ont été conservés pour des études ultérieures. Ces clones sont représentés sur les figures 9, 10 et 11, qui donnent les profils, vis-à-vis de Nm, N1 et Ng, de 5 clones de la banque Bam (figure 9), de 16 clones de la banque Eco (figure 10), et de 13 clones de la banque Cla (figure 11).

Ces clones ont été séquencés en utilisant des amorces universelles et inverses. Il s'agit

- des clones Bam

B11 partiel de 140 pb (SEQ ID N° 66), B13 partiel estimé à 425 pb (SEQ ID N° 67), B26 de 181 pb (SEQ ID N° 68), B33 de 307 pb (SEQ ID N° 69), B40 de 243 pb (SEQ ID N° 70),

- des clones Cla

C16 de 280 pb (SEQ ID N° 72), C20 partiel estimé à 365 pb (SEQ ID N° 73), C24 partiel estimé à 645 pb (SEQ ID N° 74), C29 partiel estimé à 245 pb (SEQ ID N° 75), C34 de 381pb (SEQ ID N° 76), C40 de 269 pb (SEQ ID N° 77), C42 de 203 pb (SEQ ID N° 78), C43 de 229 pb (SEQ ID N° 79), C45 de 206 pb (SEQ ID N° 80), C47 de 224 pb (SEQ ID N° 81), C62 de 212 pb (SEQ ID N° 82), et C130 (5'...) estimé à 900 pb (SEQ ID N° 83), et

- des clones Eco

E2 de 308 pb (SEQ ID N° 84), E5 partiel, estimé à 170 pb (SEQ ID N° 85), E22 partiel estimé à 300 pb (SEQ ID N° 86), E23 de 273 pb (SEQ ID N° 87), E24 de 271 pb (SEQ ID N° 88), E29 de 268 pb (SEQ ID N° 89), E33 partiel, estimé à 275 pb (SEQ ID N° 90), E34 partiel, estimé à 365 pb (SEQ ID N° 91), E45 de 260 pb (SEQ ID N° 92), E59 estimation supérieure à 380 pb (SEQ ID N° 93), E78 de 308 pb (SEQ ID N° 94), E85 de 286 pb (SEQ ID N° 95), E87 de 238 pb (SEQ ID N° 96), E94 partiel, supérieur à 320 pb

(SEQ ID N° 97), E103 partiel, supérieur à 320 pb (SEQ ID N° 98) et E110 de 217 pb (SEQ ID N° 99).

La cartographie de chaque clone a été effectuée sur le chromosome de Nm Z2491 en opérant comme décrit dans l'exemple 2. Les résultats obtenus sont donnés sur la partie droite de la figure 2. On constate que ces clones correspondent aux régions appelées 4 et 5. Ces régions sont donc constituées de séquences présentes à la fois chez Nm et chez Ng, mais non trouvées chez N1. Il est donc considéré qu'il s'agit de séquences codant pour des facteurs de virulence responsables de la colonisation initiale et de la pénétration de la muqueuse. La région 4 est localisée entre *argF* et *regF* sur le chromosome de Nm 2491 et la région 5 entre le marqueur lambda 375 et *penA*. Cette région contient vraisemblablement des séquences codant pour un variant Opa et une protéine liant la transferrine.

Une comparaison avec les séquences connues dans les banques de données a montré que dans la région 4 seul le clone C130 présente une homologie, à savoir avec *MspI* méthylase. Dans la région 5, aucune homologie avec des séquences connues n'a été trouvée avec les clones C8, E2, B40, C45, E23 et E103. Pour les autres clones, les homologies sont les suivantes :

B11 arginine décarboxylase *SpeA*; C29 arginine décarboxylase *SpeA*; C62 oxoglutarate/malate transporteur; répétitive DNA element; E34 élément répétitif d'ADN ; E94 endopeptidase *MepA* murine ; C47 citrate synthase *PrpC*; E78 citrate synthase *PrpC*

Exemple 5 : Mise en évidence de la présence d'une ou plusieurs souches de *Neisseria meningitidis* dans un échantillon biologique.

Un échantillon biologique de type liquide céphalo-rachidien, urine, sang, salive est prélevé.

Après filtration et extraction, les ADN présents dans cet échantillon sont soumis à électrophorèse sur gel et transférés sur membrane par Southern blotting.

5 Une sonde nucléotidique constituée par le marquage au ^{32}P de la SEQ ID n°5 est incubée avec cette membrane de transfert.

Après autoradiographie, la présence de bande(s) réactive(s) permet de diagnostiquer la présence de *Neisseria meningitidis* dans l'échantillon.

10

Exemple 6 : Composition vaccinale incluant dans son spectre une prophylaxie à visée anti-méningococcique et destinée à prévenir toute forme d'infection par *Neisseria meningitidis*.

15

Le peptide codé par une séquence incluant la SEQ ID n°10 est conjugué à une toxine.

Ce peptide conjugué est alors ajouté à une composition comportant le vaccin anti-*Haemophilus* et anti-pneumocoque, ou tout autre vaccin de l'enfance.

20

La composition résultante peut, après avoir été rendue stérile, être injectée par voie parentérale, sous-cutanée ou intramusculaire.

Cette même composition peut également être pulvérisée au niveau des muqueuses à l'aide d'un spray.

25

46
LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I.N.S.E.R.M
- (B) RUE: 101, rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS CEDEX 13
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L' INVENTION: ADN, proteines et peptides spécifiques des bacteries de l'espece *Neisseria meningitidis*, leurs procédés d'obtention et leurs applications biologiques.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 99

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0. Version #1.30 (CEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 257 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: 22491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GATCCGCTGC CGGCAGACGA ATATCAAGAC ATCTTCGATT TTATGAAACA GTATGACTTG

60

47

TCTTACCCGT ATGAATATCT GCAGGATTGG ATAGATTACT ATACGTTCAA AACCGATAAG 120
CTGGTATTTG GTAACCGGAA GCGAGAGTGA GCCGTAAAAC TCTGAGCTCC TGTTTTATAG 180
ATTACAACCT TAGGCCGTCT TAAAGCTGAA AGATTTTCSA AAGCTATAAA TTGAAGCCCT 240
TCCACAGTAC ATAGATC 257

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 276 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GATCATGTTT AAATAGATAG GCATGGGAAG CTGCAGCTCT AACGTCCATG AAAATATGTT 60
GCATAGCTGC AAGCGGAACG CTTTTCTTT CATCTACATA ATCTATAGAG TCAAGGCAAC 120
CGCTATTGAA ATTAGCAGTA TTGCCTATGA TTACATTAGT AATATGCTCA TACCATTTTT 180
GGGTGGTCAT CATATTGTGC CCCATTGTFA TCTCCTTATA TTGGTTTITAG AAGGAACTTT 240
GACAGGAAGA ATAACGGCCT TACCTGTTTG ACGATC 276

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 428 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
 (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

```

GATCTGGTGG TGTTCGCACA GGTAGGCGCA TACTTGTTCS GGA CTGAGTT TSCGGCGGAT    60
AAGGGTGTCG ATGTGCTGAA TCAGCTGCGA ATCGAGCTTA TAGGGTTGTC GCTTACGCTG    120
TTTGATAGTC CCGCTTTGCC GCTGGGCTTT TTCGGCGCTG TATTGCTGCC CTGGGGTGCG    180
GTGCCGTCTG ATTCGCGGC TGATGGTGCT TTTGTGGCGG TTAAGCTGTT TGGCGATTTC    240
GGTGACGGTG CAGTGGCGGG ACAGGTATTG GATGTGGTAT CGTTCGCCCTT GGGTCAGTTG    300
CSTGTAGCTC ATGGCAATCT TTCTGCAGG AAAGGCGGTA TGCTACCGCA TACTGGCCTT    360
TTTCTGTTAG GGAAAGTTGC ACTTCAAATG CGAATCCGCC GACCTCTTTC AGTTACAGCA    420
GCTTGATC                                         428
  
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 390 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
 (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

GATCCTGCAT TGACATCGGC CTGGGCTGTC AGGGTATTGT GACCGGTAAA GTCGGCATT A    60
CCGTTGGCCA ATAAGGATAC ATGACCGTCT GCAGAAACAG CATGAAGGCC GTCTGAAACG    120
ATATTGCCCT GCAATGCGST GGTTCGAGA GCCTTGGCTG CGTTCAGCTT GGTATTGCCA    180
AGCTGAATAT TGCCTTTGGC TGCCTGAATG TGCAGATTAC CCGAGTTGGT ACGCAGATTG    240
  
```

49

GTATTGGTAA CATTAGCAA GCCTGCCTCC ACACCCATGT CTTTGGAGGC AGTGAGGGTT 300
TTACTGGTGC CGGTAATATG GGCAGCGTTA TCCGATTTC AATGGATGCT GGCCGGCAGA 360
CAAATCTTTA TCAACATTCA AATTGAGATC 390

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 177 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GATCAGATTG GTGAAGACGG TATTACCGTC AATGTTGCAG GCCGTTCCGG ATATACGGCG 60
AAAATCGACG TGTCTCCGAG TACCGATTTC GCGGTTTATG GCCATATTGA AGTTGTACGG 120
GGTGCAACGG GGTGACCCA ATCCAATTCA GAGCCGGGTG GAACCGTCAA TTTGATC 177

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 341 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

50

GATCAATGAT GCTACTATTC AAGCGGGCAG TTCCGTGTAC AGCTCCACCA AAGGCGATAC 60
TGAATTGGGT GAAAATACCC GTATTATTGC TGAAAACGTA ACCGTATTAT CTAACGGTAG 120
TATTGGCAGT GCTGCTGTAA TTGAGGCTAA AGACACTGCA CACATTGAAT CGGGCAAACC 180
GCTTTCTTTA GAAACCTCGA CCGTTGCCTC CAACATCCCT TTGAACAACG GTAACATTAA 240
AGGCGGAAAG CAGCTTGCTT TACTGGCAGA CGATAACATT ACTGCCAAAA CTACCAATCT 300
GAATACTCCC GGCAATCTGT ATGTTCATAC AGGTAAAGAT C 341

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 164 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATCCAAC TG TTGATTTTA CTGGCTGCTT CTCCATGCGC GGTATTGACC AAAGCCGCAA 60
GGATATTGCG TTCCAGATTG TCTTTCAGGC TGCCGCCGTT GACAGCGGTA TTAATCAGTG 20
CGGCACTGCC CCGATTGGCT AGGTTGACCG TCAGGTTGTT GATC 164

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 219 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
 (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

```
GATCAATCAC ACATCTTGTC ATTTTTCGA TTCCTTCATT TCGGTTTCTA ATGTTTCAAT   60
TCTTGCGGCC ATTTCCTGAA TGGCTTTAGT CAAAACGGGG ATGAACGCTT CGTATTCGAC   120
GGTGTAGGTA TCGTTTGTTT TATTTACCAT CGGCAATCGA CCATATTCAT CTTCCAGCGC   180
AGCAATGTCC TGGGCAATAA ACCAATGCCG CAACCGATC                           219
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 356 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
 (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

```
GATCTTGGGT AAGCCCCCAA CCTGCATAGA AAGGCAGGCC GTAGCAGCTG ACTTTTTTGC   60
CGCGCAACAA GGCTTCAAAA CCGGTCAGCG AAGTCATGGT ATGTATTTCT TCTGCGTATT   120
GGAGACAGGT CAGGATGTCG GCTTGTTCCG CGGTTTGGTC GGCATATCGT GCAGCATCAT   180
CAGGGGAAAT ATGGCCGATG CGGTTACCGC TGA CTACATC GGGATGCGGT TTGTAGATGA   240
TATAGGCATT GGGGTTTCGT TCGCGTACGG TACGGAGCAA ATCCAGATTG CGGTAGATTT   300
GGGGCGAACC GTAGCGGATA GACGCATCAT CTTCAACCTG GCCGGGAACG AGGATC       356
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 210 paires de bases

52

- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

```
GATCCGCTTT CAGTTTCCGT ACCGGTGGCA TCAGTCAAGT CCGTTTTGTG CACCAAACCG 60
CGTCCATATG AAACATAAAA CAAATCGCTT AAGCCCAAAG GGTATCGAA CGATAAAGCG 120
ACATTTCTTT GATATTTGCC GGTGTTTTTG CCGCCCGCAT CATCTATACC GATACTGAAC 180
CGTATGGGTT TATTCTGCTG CCATTTGATC 210
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 259 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

```
GATCCCGAAA CGCAATTGGT CGAAAGCTAT ATGCTGAACG ATGTGTTGCG GTTTTGGGAC 60
AGCGCAGGTT TGGGCGATGG GAAAGAAGCC GACCGCGCCC ATCGGCAAAA ACTGATTGAT 120
GTCCTGTCTA AAACCTATAC TCATTCGGAT GGGCAGTGGG GCTGGATAGA TTTGGTGTTC 180
GTTATCCTTG ACGGCAGCTC CCGCGATTTG GGTACGGCCT ATGATTTGTT GAGGGATGTT 240
ATCCTTAAAA TGATTGATC 259
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 436 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

```
GATCAAATGG ATGATTTATA TAGAATTTTC TTTTACGACT GCGTGCCGTT TGAAAAGAAA      60
ATGCACAATC CCGTATCTCA TCGTGCCATA GATTTTTTCAA AGACTCCGGA AGCCATATTT      120
CGTTGCAATC TGCATACCGA ATTGAAGAAG AAGCGTAAAT TAGCGTTACG TTTAGGCAAG      180
CTGTCCGACA ATACAGCATG GATATTAAAA CCCCAAGTCA TGAAAAATCT TCTGAAAAAC      240
CCGTCAACTC AAATTACGGA AAACGATGTC GTGCTCGATG TTAAACAAAA AGGTGTAGAT      300
ATGCGTATAG GCTTGGATAT TTCATCTATT ACCTTAAAAA AACAAGCCGA TAAAATCATC      360
TTGTTTTCTG GTGATTCGGA TTTTGTCCCA GCAGCCAAAT TAGCCAGACG GGAAGGTATC      420
GATTTTATTC TTGATC                                     436
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 363 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

```
GATCGTTTTA CGTCGCAATC GAGCTTTGTG GTGCGCTCSC CTAAAAGCCA ATCTTCTCTC   60
AATGGCCTGG GTGCCATTTT GCAGGGCACA GGTTTTGCCC GTGCGCAAGA CGATATTTAT   120
ACCGTGCAGG AATATATGCA GTCGCGTTCC GCTTTGGATG CSTTGCSTAA GAAAATGCCC   180
ATTCGCGATT TTTATGAAAA AGAAGGCGAT ATTTTCAGCC GTTTTAATGG TTTTGGCCTG   240
CGTGGCGAGG ATGAGGCGTT TTATCAATAC TACCGTGATA AGGTATCCAT CCATTTTGAC   300
TCTGTCTCAG GCATTTCCAA TTTGAGCGTT ACATCGTTTA ATGCCGGTGA ATCTCAAAAG   360
ATC                                                                           363
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 314 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

```
GATCTTGGCT CATTTATATC TTCACGATA TTGCAATTAC CGCCGTTCCA GTTGAAATAA   60
CAACGACTAA AATTGTAGTT CCTAAAAGAA TCATTCCTAT TCTTGGGTAC CATTTCCCAA   120
TAATTGCGCC CGACAATTC CATTTAATGC TCCATCAGTT CTTTACTTC CGGAAATCTG   180
CTGTAATCTG ACATAAGACG CATAATTGAA CTATCAACGC CGTAACAGCC ATAGGTTTTA   240
ATACCGTTTT CGGCGTGTTC CCAAATGCAA TTAGTGATT CGTAGCCTTT TACAAATTTA   300
TCGGTTTCGG GATC                                                                           314
```


(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 256 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

```
GATCATACGA ATCTACCCTA AAATACCCCG TCGCCGATTT AGGATTGGCT ACATAAAGCT 60
CATTATAAGG GTATTTTGAT GACATGATAC GGTAAATTC ATTGCCGTTG TTTATCCTGA 120
TTCTATAAAT TGGTTCAACA GCAAAGCCTC TGGATTCCCT TAATTGATTA TAATATTGCC 180
TGTATGTTTG TACATCATGT CTGTCCACG GCTCTCCAGG AGTCCTCAGA ATAGCAATCC 240
CGTTAAATTT CGGATC 256
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 235 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

```
GATCCACGCC TGTGCCTACC TTGGCTTTTT GTTCGCCAAA CAAGGCATTT AAGGTTGAGG 60
ACTTGCCGAC ACCTGTGCA CCGACAAGCA AGACATCCAA ATGACGGAAA CCGGCTGCTG 120
```

56

TGACTTTTTTG CCGGATTTC AAAATACGGT AACGATGCAT ATGCGCTCCT ACCAGCCAAA 180
AAAAGAAGCA ACCGTGCTAA TCGCCCCCTCC AATCGCTTTT GCAGCACCGC CGATC 235

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 259 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GATCCAACGG GCATCGCTGT CTTACTCGG TGTGGTTTGA CCGCTGATTT GTCCTTCTTC 60
GTCAACTTCT ATGGCCTGAC GCTGTTTGCT GCCGGCGGTC TGGATAATGG TGGCATCAAC 120
GACGGCGGGC GATGCTTTCT CTATTTTATAG GCCTTTTTCG GTCAGTTGGC AGTTAATCAG 180
TTTGAGTAAT TCGGACAGGG TGTCGTCTTG CGCCAGCCAG TTGCGGTAGC GGCATAAGGT 240
ACTGTAATCG GGGATGATC 259

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 201 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE. SEQ ID NO: 18:

GATCTGTGCC GTTGATTTTA TCTTTCAGAT GCAGCATCGA ATATCGGAAA GCCAAATCAG 60
CAATTCTTTT TGCATCGTGT GGATTTTGAG ACGGGCCTAA TGACCGTACC CGCTTAATAA 120
AAAATGCACC GTCAATCAAA ATGGCGGTTT TCATATTGCT TCCCCTATAT TTGTCAAAGA 190
TATAAAAAAG CCCTTGGGAT C 201

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 334 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AATTCAAAGG AGGCATTTGT TGCAAGAAAA GTACAAAGTG ATTTGCAAAA AGCATTGAAT 60
GCTAGCAACT ATAACAAGCA GCAATATGCA AGACGTGCGG CAACAGCGTT AGAGAATGCT 120
TCAAAATCAA AAGTTATGGC AGCGAATTCT TTTTGATCTA TCTTGTGCGA ACGGGTCAAA 180
TATTCCTTCGT ACATTGAGTT AATCGTACCA ATCGCCCTAA CCACATTTTC ATCAGAAAAT 240
ATGGAAATAA TAGCATCCCT ATACGCACCT AGTGTAATAT TGTTTCTATT ATTAGTTATA 300
GCATTATTCG AATACATAAT AGCACCTCCA AATT 334

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 238 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

58

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*

(B) SOUCHE: C2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

```
AATTCCTGCG CACCTTTGCC GATGGGGAGA TAATCGCCTT TTTGCAGCAT TCTGCCCTGA    60
TGGCCGCCGA AACCGGCTTT CAGGTCCGTA CTTCTCGAAC CCATCACTTC CGGCACATCA    120
AATCCGCCCC CCACGCACAC ATAGCCGTAC ATGCCCTGCA CGGCACGCAC CAGTTTCAAG    180
GTCTGCCCTT TCGGGGCGGT ATAACGCCAA TACGAATAGA CCGGTTGCGC GTCCAATT    238
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 249 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*

(B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

```
AATTGGGCGA GATGCTGCCG GAAACGGATT TAAAACAGAT TCGGGCGGCA GTGTTGAAGA    60
CGAACGATGA GCGGCATTG CAGAAGGTGG TGAAAACGGC CAAAGGCAAT GCGCGGAAAC    120
TGTCGAAGCT GCTGCTGATT GTGGACTATT TGTTGCAGGT TAACCCTGAT GTTGATTG    180
ATGATGATGT AATCGAACAC GCGGAAACCT ATTTAATCCA CTAAACCTTT GACAGATAAG    240
GCAATAATT                                     249
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

59

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE

- (A) LONGUEUR: 212 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (genomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

```
AATTTATGTA CGGTTTTGCC GTTTGCAGTC AGCCAGTCGG CAAGGCGCAG AAAAAAATCG      60
CCGACAGGGC CTTGAAGCAG CAGGATATTT TCTGCGCTTT CAAGCAGGTT TTGCAGGTTA      120
TTTTTGAGGA CGTCTGTTT CATGTTGCAA TGTGGTTTTG TTTTATATGT AATAGTTTTA      180
GGTTGAACTT TCAAGCATAC GCCAAGAGAA TT                                     212
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 227 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (genomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

```
AATTCAGTGC CTGCGTCATA TCACGGCTAC CTTGTGGTTC AGGGTTACTG TATCGCCCGC      60
GGCATCGACG GCTTCAATAT GCAGCTTCAG CCAGCCGTGC TGCGGGGCGG ATGCGGTTAC      120
TTGGATGGAT TGGGCGCGTT TGGACTGAAT CACGGGCTGC AAGGCTTGCT CGGCGTACTG      180
TTTGGCCAGT ACTTCGATGC GCTTTAAATG CTTTGGCGG CGCAATT                      227
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 167 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

```
GATCCAGGAC TCAAAAACCG ATTCCTAAT AGAGTGTCTA ATATCCCAAT CTTTTTTACC    60
CCCTCTGCTG TAGAATTGAT AGAGAAAGTT TGTCTATCTT TTTCATATAC CCATGCCCTTC    120
TTTTTATCAT TGTAGCTAAC ATAACCGCCA AACAATGCTT CTAGATC                    167
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 251 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

```
AATTCTTGCG GCCATTTCTT GAATGGCTTT AGTCAAAACG GGGATGAACG TTTCGTATTC    60
GACGGTGTAG GTATCGTTTG TTTTATTTAC CATCGGCAAT CGACCATATT CATCTTCCAG    120
CGCAGCAATG TCCTGGGCAA TAAACCAATG CCGCAACCGA TCTTCTTTAT GACTGCCGTC    180
```

CTTGATTGGA TTCGCCCACC ATTCGCGGAC TTTGTCCGCT CGTTCATCTG CCGGCAAGTC 240
TTTGAATAAT T 251

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 207 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

AATTCCCGAC TATCGCGGAT GCGTAGTTTT TGCCGGTGGG CAAGAGCAGG TGTGGGATAA 60
GTTAGGTGAT TTGCCCCGATG GCGTCAGCCT GACCCCGCCT GAATCGGTAA ATATTGACGG 120
CTTAAAATCC GTAAAACTCG TCGCATTAAA TGCTGCCGCT CAGGCTTTTA TTAACAAGCA 180
CGCCGGTATC GACAGCGTAC CTGAATT 207

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 379 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

AATTGTTTTGG GAATAATCCA AACAAACAGC ATCAGGATAG CGGCGGCGGT CAGGCTGCCT 60

62

GAAAGGATTT TGCCGGGGTT TTTTGTAGGC AAAGCGGACG AGAAACCAAA GCAACAGCAG 120
 CATGGTGTCC CAATAGCCGA TTGAGAATAG GATGGCCAAA CCTTCTAGGA AATGGCGTAA 180
 ATCGTTTGTG GTAACCATGG GTAGTTCCTG TGGTTAAATG TGCAGGCTGC TTTTGGCCGA 240
 ACCTTGCCGC ATCTCAAAAG CAGCCTGCGC TTCAGCGTTG CGTTACGCAG TAAAATAATG 300
 AATATTTGTA ACGGCTTGGG TATTTTTTGT CAATATTCCT GCCCTTCCCT TAACAGCTGC 360
 CGCGCTTTCC GTTAAAATT 379

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 274 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

AATTCGCCGA AATCAGGCTG CTGCTCGATA ATCGGCGCGG CCGATTGGCG TTGTGCCTCG 60
 ATTAAATCCA TCTTGTCTTG CAGACGTTTG GCCTGGCCTT TCGGCGGCGG TTCGGCCAGT 120
 TGTTCCATCC GCGTTTCGCG AAATGCCGCC CGTTTGTGTC CGTTGAATAC CGCTTTGCAA 180
 ATCACCTTGC CCTGCATATC CTTACAATC ACATGGTCCG CATCGTGGAT GTCGTAAGCC 240
 ACCCGTACCT TCTGACCGCT GTAATCCAGC AATT 274

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 263 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

63

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*

(B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

```
AATTCGGTTC TTATTGGGCT TTTTCCATCC ATCGGGTATG CCTGAAGGGA ACGCAAACCC    60
TGCCACTTGC CCATCGCTCC ATTCCCGCAT TAGCGCGTCT GACGGCAAGT GTTCTCGCGC    120
CCAATCAAGC CACGCCTGCC GCATTGCGGC CTTGTCTTGC TGAAAACTTC GCAGTGCTTT    180
TGCAACCGGC CCATCATTA AATTCAATCAA ATAAATCATT ATATTTGCGT TCATTTTTC    240
TACACCTTCG CCACATCCAA ATT                                             263
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 316 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*

(B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

```
AATTGTTCAA GAAAAAAGTC GGCACGGGCG GGCAACGGGG AAAATGCGTT GACGCCGTCT    60
TTTTCTAAGG TGATGTAGTA GGGGCGGAAA TAGCCTTCTT CAAACGCCCA GAAACTGGCT    120
TGGTTTTTCGT TTGCAATGCG TTTTGCAATG ACGTGATAAG GCGGTGTGTC GCCAAAGCAG    180
ACAACGGCCT GGATGTGATG TTGAGTGATG TATTCTTGCA AAAACTCAGG AAAGGCGTCG    240
TAGTTGTCGT TAAAAACAAC GGTATGCGCT TGAGTGGGCG GATAAAAATA GTCGTGCGCT    300
```

GCATTAAAGT TGAATT

316

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 324 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

```
AATTCAATCA ACGGAAAACA CATCAGCATC AAAAACAACG GTGGTAATGC CGACTTAAAA    60
AACCTTAACG TCCATGCCAA AAGCGGGGCA TTGAACATTC ATTCCGACCG GGCATTGAGC    120
ATAGAAAATA CCAAGCTGGA GTCTACCCAT AATACGCATC TTAATGCACA ACACGAGCGG    180
GTAACGCTCA ACCAAGTAGA TGCCTACGCA CACCGTCATC TAAGCATTAC CGGCAGCCAG    240
ATTTGGCAAA ACGACAAACT GCCTTCTGCC AACAAGCTGG TGGCTAACGG TGTATTGGCA    300
CTCAATGCGC GCTATTCCCA AATT                                           324
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 230 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(X1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

AATTATGCAA AAAAACGCAA CGCCGAAAAA CTGGCACCGC GCGGATATTG TTGCTGCTTT 60
GAAAAAGAAA GGCTGGTCAC TTCGAGCACT TTCAATAGAA GCGGGGTTGT CGCCGAATAC 120
GCTTAGAAGC GCACTGGCCG CCCCTTATCT TAAGGGAGAA AGGATTATTG CCGCTGCAAT 180
CGGAGTGGAA CCGGAAGAGA TTTGGTCCGA ACGGTATGCA GATCGGAATT 230

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 249 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(X1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

AATTTAATCG GTGGAATGCC TGTTC AACCG CACCAATCCC GCTGAATACG GTTGCTAATC 60
TAATATGTGA ATCAGGTTTA AGAAAAGTTT TAGATTTCCTA ACCTTGTTGA CTGGGAAAGA 120
GCAAAGTTTT TTSTAATCGA GATCGTGTG TCTGTGCCAT TGTCGAAATA GTCATACTTA 180
TATCGTTCTG TTTATCTTAT CAATATGAAA ACTACATCGT TGATTGCCCT GACAATGCCT 240
TGGTCAATT 249

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 343 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

66

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
 (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

```

AATTCTTGTG CCGGAGTCCA ACGTATATTT ACCCTCCTGC GAGCTAAAAG ACTATTATTC      60
TCCACTGCCA CAGTAGCCGC ATTCACCGCC GTATTACAT CCCCTTTAAC CAATGCCACT      120
GCGCTGCCTG CGATAATCTG CGAGTAGGCT ATGACTTTTT GCGCTTCTTG GGGTGACAGT      180
TTGCCTACAT CGCTCCGTC CAACAGGGTT TCTCCACCA TCTCGCCGAC TGCCGCGCCG      240
ATTGCGCCGT CCGACATTT GCCTTTATTT GCTACCGCCG ATGCACAGCC TGCTACGGCA      300
TGGGCTATCT TGTGGGCAAT GTAGTCTTCG CTGAGATTAA ATT                        343
  
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 184 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
 (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

```

AATTCTTCAA ACATCGTTTC GATAATCGGG TCGGTGTACA CACTGATGCG GTCGCCCGCA      60
CGGCTTTGAC CGGCTCGGAA AATATAGGCG GTGGCTTTGC CGTCGGCGAT GTCGACGCAC      120
CAACGCCAGA TGCGTCTTC GGTATTCAAA CAATCACCCG CACAGCTTTC ACCTGCGCGG      180
AATT                                             184
  
```

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

TATGCTCAAT CTCATTTTCA AAATGCAAAA CTTTTCTGAT TTTTCCTACT TTTTGCTCAA 60
TATTAGGAAG GTTTTAGGCA ATTGAAAATT TTTTGGCGCA TTTTATGCG TCAAAATTCG 120
TTAACAGACT ATTTTGTCAA AGGTCTCCCT CTGTAAAAGC AAGGATAGGG CATCTGCCCT 180
TTTGATTGTT TGATTAACGA TACAAGGAGT TTCAAAATGA GAGTTTTATA GTGGATTAAC 240
AAAAACCAGT ACAGCGTTGC CTCGCCCTGC CGTACTATTT GTACTGTCTG CGGCTTCGTC 300
GCCTTGTCCT GATTTAAATT TAATCCACTA TATGTGTTCA TGAAATGACT TGGGTCCGAG 360
GCTCAGGTAA TGCGCAACAA AGTTCATATT ATTGCGAAAT TTGCGAATCT GCAGGGCTTA 420
ACGATACGGG AAATCCTGAT AAATCTTTAG GATTGCCAAA CAATACGTTT AGTAATCCGC 480
CTGTTTGGGG AGCTACAATC GGAGCTTTAG CAGGTAGCCG CATAGGTATG CCTGAATTTG 540
GTACGTTTGC GAGCCATGCC ATTGAAAATT TCGACTGGTC ATGGTATCGA CGTTATAGGG 600
AAATTGCCGA AACGATTGAA CGAGAATATT CAGGCGGTTT GCCTTAATAG TTGAGGAGGT 660
CATGATGTTT GCCAAACATT ATCAATTCAT CGCACTCGGC ATCATGCTGC TTCTTTATAT 720
GTTGATTCTC TATACGACCG ATTTTCCAA TCTGACGTAT TGGATGCTGT TTTTATCTG 780
TTTTATTACA GGAAAAATAT TAGCTCGTTT GTTAGAGAAA AGCTTTAAAT AAAATAGCAG 840
CTAGTCGCAA AAGGTCGTCT GAAACCTTTT CAGGCGGCCT TTCTAAAATA CATCCAATT 900
CCTAATCCCT ATTTTTCAAA AAGGAAATCT ATGCCCCATC TGCAAAACCT GTCTTTGGGC 960
TTAAAGAAAA AGCTGCCTGT TATCCTGCAA ACAGAAATAT CAGAATGCGG CTTGGCATGT 1020
CTGGCGGCTG TGGCGGGATT TCATGGTTTC CATACGAATT TACGCGCACT GCGTTCAAAA 1080
TACTGTCCGA GACCTTTGCA AAATTCCCCA AAATCCCCTA AATGTCTTGG TGGAATTTT 1140
GGGAATTTT GCAAAGGTCT CATTCTATAA CTGTAAATAC TTTTAAATTT ATGACAAAAT 1200
AGTAAATATT GCTAAAATAA TATTGATGTC ATGAAATTTT TTCCTGCTCC ATGTCTGTTG 1260
GTTATCCTGG CTGTCATACC CCTTAAAACC TTAGCTGCCG ATGAAAACGA TGCAGAACTT 1320
ATCCGTTCCA TGCAGCGTCA GCAGCACATA GATGCTGAAT TGTTAACTGA TGCAAATGTC 1380

CGTTTCGAGC AACCATTGGA GAAGAACAAT TATGTCCTGA GTGAAGATGA AACACCGTGT	1440
ACTCGGGTAA ATTACATTAG TTTAGATGAT AAGACGGCGC GCAAATTTTC TTTTCTTCCT	1500
TCTGTGCTCA TGAAGAAAC AGCTTTTAAA ACTGGGATGT GTTTAGGTTT CAATAATTTG	1560
AGCAGGCTAC AAAAAGCCGC GCAACAGATA CTGATTGTGC GTGGCTACCT CACTTCCCAA	1620
GCTATTATCC AACCACAGAA TATGGATTCC GGAATTCTGA AATTACGGGT ATCAGCAGGC	1680
GAAATAGGGG ATATCCGCTA TGAAGAAAA CGGGATGGGA AGTCTGCCGA GGGCAGTATT	1740
AGTGCATTCA ATAACAAATT TCCCTTATAT AGGAACAAAA TTCTCAATCT TCGCGATGTA	1800
GAGCAGGGCT TGGAAAACCT GCGTCGTTTG CCGAGTGTTA AAACAGATAT TCAGATTATA	1860
CCGTCCGAAG AAGAAGGCAA AAGCGATTTA CAGATCAAAT GGCAGCAGAA TAAACCCATA	1920
CGGTTTCAGTA TCGGTATAGA TGATGCGGGC GGCAAAACGA CCGGCAAATA TCAAGGAAAT	1980
GTGCGTTTAT CGTTCGATAA CCGTTTGGGC TTAAGCGATT TGTTTTATGT TTCATATGGA	2040
CGCGGTTTGG TGCACAAAAC GGACTTGACT GATGCCACCG GTACGGAAAC TGAAAGCGGA	2100
TCCAGAAGTT ACAGCGTGCA TTATTCGGTG CCGTAAAAA AATGGCTGTT TTCTTTTAAT	2160
CACAATGGAC ATCGTTACCA CGAAGCAACC GAAGGCTATT CCGTCAATTA CGATTACAAC	2220
GGCAAACAAT ATCAGAGCAG CCTGGCCGCC GAGCGCATGC TTTGGCGTAA CAGGTTTCAT	2280
AAAACCTCAG TCGGAATGAA ATTATGGACA CGCCAAACCT ATAAATACAT CGACGATGCC	2340
GAAATCGAAG TGCAACGCCG CCGCTCTGCA GGCTGGGAAG CCGAATTGCG CCACCGTGCT	2400
TACCTCAACC GTTGGCAGCT TGACGGCAAG TTGTCTTACA AACGCGGGAC CGGCATGCGC	2460
CAAAGTATGC CCGCACCTGA AGAAAACGGC GGCGGTACTA TTCCAGGCAC ATCCCGTATG	2520
AAAATCATAA CCGCCGGATT GGATGCAGCG GCCCCGTTTA TGTGGGCAA ACAGCAGTTT	2580
TTCTACGCAA CCGCCATTCA AGCTCAATGG AACAAAACGC CTTTGGTTGC CCAAGACAAG	2640
TTGTCTATCG GCAGCCGCTA CACCGTTCGC GGATTTGATG GGGAGCAGAG TCTTTTCGGA	2700

GAGCGAGGTT TCTACTGGCA GAATACTTTA ACTTGGTATT TTCATCCGAA CCATCAGTTC 2760
TATCTCGGTG CGGACTATGG CCGCGTATCT GCGGAAAAGT CACAATATGT ATCGGGCAAG 2820
CAGCTGATGG GTGCAGTGGT CGGCTTCAGA GGAGGGCATA AAGTAGGCGG TATGTTTGCT 2880
TATGATCTGT TTGCCGGCAA GCGGCTTCAT AAACCCAAAG GCTTTCAGAC GACCAACACC 2940
GTTTACGGCT TCAACTTGAA TTACAGTTTC TAACCTCTGA ATTTTTTTAC TGATATTTAG 3000
ACGGTCTTTT CTTATCCTCA GACTGTCAAA CTTTACCTAC GTACTTGGCG CGCAGTACGT 3060
TCATCTTCAA AATGGAATAG ACATGAATAA AGGTTTACAT CGCATTATCT TTAGTAAAAA 3120
GCACAGCACC ATGGTTGCAG TAGCCGAAAC TGCCAACAGC CAGGGCAAAG GTAAACAGGC 3180
AGGCAGTTCT GTTTCTGTTT CACTGAAAAC TTCAGGCGAC CTTTGCGGCA AACTCAAAAC 3240
CACCCTTAAA ACCTTGGTCT GCTCTTGGT TTCCCTGAGT ATGGTATTGC CTGCCCATGC 3300
CCAAATTACC ACCGACAAAT CAGCACCTAA AAACCAGCAG GTCGTTATCC TTAACCAAA 3360
CACTGGTGCC CCTTGGTGA ATATCCAAAC TCCGAATGGA CGCGGATTGA GCCACAACCG 3420
CTATACGCAG TTTGATGTTG ACAACAAAGG GGCAGTGTTA AACAACGACC GTAACAATAA 3480
TCCGTTTCTG GTCAAAGGCA GTGCGCAATT GATTTTGAAC GAGGTACGCG GTACGGCTAG 3540
CAAACCTAAC GGCATCGTTA CCGTAGGCGG TCAAAAGGCC GACGTGATTA TTGCCAACCC 3600
CAACGGCATT ACCGTTAATG GCGGCGGCTT TAAAAATGTC GGTGCGGGCA TCTTAACTAT 3660
CGGTGCGCCC CAAATCGGCA AAGACGGTGC ACTGACAGGA TTTGATGTGC GTCAAGGCAC 3720
ATTGACCGTA GGAGCAGCAG GTTGGAATGA TAAAGGCGGA GCCGACTACA CCGGGGTACT 3780
TGCTCGTGCA GTTGCTTTGC AGGGGAAATT ACAGGGTAAA AACCTGGCGG TTTCTACCGG 3840
TCCTCAGAAA GTAGATTACG CCAGCGGCGA AATCAGTGCA GGTACGGCAG CCGGTACGAA 3900
ACCGACTATT GCCCTTGATA CTGCCGCACT GGGCGGTATG TACGCCGACA GCATCACACT 3960
GATTGCCAAT GAAAAAGGCG TAGGCGTCAA AAATGCCGGC AACTCGAAG CGGCCAAGCA 4020
ATTGATTGTG ACTTCGTCAG GCCGCATTGA AAACAGCGGC CGCATCGCCA CCACTGCCGA 4080

CGGCACCGAA GCTTCACCGA CTTATCTCTC CATCGAAACC ACCGAAAAAG GAGCGGCAGG 4140
CACATTTATC TCCAATGGTG GTCGGATCGA GAGCAAAGGC TTATTGGTTA TTGAGACGGG 4200
AGAAGATATC AGCTTGCGTA ACGGAGCCGT GGTGCAGAAT AACGGCAGTC GCCCAGCTAC 4260
CACGGTATTA AATGCTGGTC ATAATTTGGT GATTGAGAGT AAAACTAATG TGAACAATGC 4320
CAAAGGCTCG GCTAATCTGT CGGCCGGCGG TCGTACTACG ATCAATGATG CTACTATTCA 4380
AGCGGGCAGT TCCGTGTACA GTCACACCAA AGGCGATACT GAATTGGGTG AAAATACCCG 4440
TATTATTGCT GAAAACGTAA CCGTATTATC TAACGGTAGT ATTGGCAGTG CTGCTGTAAT 4500
TGAGGCTAAA GACACTGCAC ACATTGAATC GGGCAAACCG CTTTCTTTAG AAACCTCGAC 4560
CGTTGCCTCC AACATCCGTT TGAACAACCG TAACATTAAA GCGGAAAGC AGCTTGCTTT 4620
ACTGGCAGAC GATAACATTA CTGCCAAAAC TACCAATCTG AATACTCCCG GCAATCTGTA 4680
TGTTCATACA GGTAAAGATC TGAATTTGAA TGTTGATAAA GATTTGTCTG CCGCCAGCAT 4740
CCATTTGAAA TCGGATAACG CTGCCCATAT TACCGGCACC AGTAAAACCC TCACTGCCTC 4800
AAAAGACATG GGTGTGGAGG CAGGCTTGCT GAATGTTACC AATACCAATC TCGGTACCAA 4860
CTCGGGTAAT CTGCACATTC AGGCAGCCAA AGGCAATATT CAGCTTCGCA ATACCAAGCT 4920
GAACGCAGCC AAGGCTCTCG AAACCACCGC ATTGCAGGGC AATATCGTTT CAGACGGCCT 4980
TCATGCTGTT TCTGCAGACG GTCATGTATC CTTATTGGCC AACGGTAATG CCGACTTTAC 5040
CGGTCACAAT ACCCTGACAG CCAAGGCCGA TGTCAATGCA GGATCGGTTG GTAAAGGCCG 5100
TCTGAAAGCA GACAATACCA ATATCACTTC ATCTTCAGGA GATATTACGT TGGTTGCCGG 5160
CAACGGTATT CAGCTTGGTG ACGGAAAACA ACGCAATTCA ATCAACGGAA AACACATCAG 5220
CATCAAAAAC AACGGTGGTA ATGCCGACTT AAAAAACCTT AACGTCCATG CCAAAAGCGG 5280
GGCATTGAAC ATTCATTCCG ACCGGGCATT GAGCATAGAA AATACCAAGC TGGAGTCTAC 5340
CCATAATACG CATCTTAATG CACAACCGA GCGGGTAACG CTCAACCAAG TAGATGCCTA 5400

CGCACACCGT CATCTAAGCA TTACCGGCAG CCAGATTGG CAAAACGACA AACTGCCTTC 5460
TGCCAACAAG CTGGTGGCTA ACGGTGTATT GGCACCTCAAT GCGCGCTATT CCCAAATTGC 5520
CGACAACACC ACGCTGAGAG CGGGTGCAAT CAACCTTACT GCCGGTACCG CCCTAGTCAA 5580
GCGCGGCAAC ATCAATTGGA GTACCGTTTC GACCAAGACT TTGGAAGATA ATGCCGAATT 5640
AAAACCATTTG GCCGGACGGC TGAATATTGA AGCAGGTAGC GGCACATTAA CCATCGAACC 5700
TGCCAACCGC ATCAGTGGC ATACCGACCT GAGCATCAAA ACAGGCGGAA AATTGCTGTT 5760
GTCTGCAAAA GGAGGAAATG CAGGTGCGCC TAGTGCTCAA GTTTCCTCAT TGGAAAGCAA 5820
AGGCAATATC CGTCTGGTTA CAGGAGAAAC AGATTTAAGA GGTTCATAAA TTACAGCCGG 5880
TAAAAACTTG GTTGTCGCCA CCACCAAAGG CAAGTTGAAT ATCGAAGCCG TAAACAATC 5940
ATTGAGCAAT TATTTTCCTA CACAAAAAGC GGCTGAACTC AACCAAAAAT CCAAAGAATT 6000
GGAACAGCAG ATTGCGCAGT TGAAAAAAG CTCGCCTAAA AGCAAGCTGA TTCCAACCCT 6060
GCAAGAAGAA CGCGACCGTC TCGCTTTCTA TATTCAAGCC ATCAACAAGG AAGTTAAAGG 6120
TAAAAAACC AAAGGCAAAG AATACCTGCA AGCCAAGCTT TCTGCACAAA ATATTGACTT 6180
GATTTCCGCA CAAGGCATCG AAATCAGCGG TTCCGATATT ACCGCTTCCA AAAAACTGAA 6240
CCTTCACGCC GCAGGCGTAT TGCCAAAGGC AGCAGATTCA GAGGCGGCTG CTATTCTGAT 6300
TGACGGCATA ACCGACCAAT ATGAAATTGG CAAGCCCACC TACAAGAGTC ACTACGACAA 6360
AGCTGCTCTG AACAAGCCTT CACGTTTGAC CGGACGTACG GGGSTAAGTA TTCATGCAGC 6420
TGCGGCACTC GATGATGCAC GTATTATTAT CGGTGCATCC GAAATCAAAG CTCCTCAGG 6480
CAGCATAGAC ATCAAAGCCC ATAGTGATAT TGTACTGGAG GCTGGACAAA ACGATGCCTA 6540
TACCTTCTTA AAAACCAAAG GTAAAAGCG CAAAATCATC AGAAAAACCA AGTTTACCAG 6600
CACCCGCGAC CACCTGATTA TGCCAGCCCC CGTCGAGCTG ACCGCCAACG GTATCAGCT 6660
TCAGGCAGGC GGCAACATCG AAGCTAATAC CACCCGCTTC AATGCCCTG CAGGTAAAGT 6720
TACCCTGGTT GCGGGTGAAG AGCTGCAACT GCTGGCAGAA GAAGGCATCC ACAAGCACGA 6780

GTTGGATGTC CAAAAAAGCC GCCGCTTTAT CGGCATCAAG GTAGGTAAGA GCAATTACAG	6840
TAAAAACGAA CTGAACGAAA CCAAATTGCC TGTCCGCGTC GTCGCCCAAA CTGCAGCCAC	6900
CCGTTTCAGGC TGGGATACCG TGCTCGAAGG TACCGAATTC AAAACCACGC TGGCCGCTGC	6960
CGACATTTCAG GCAGGTGTAG GCGAAAAAGC CCGTGTCGAT GCGAAAAATTA TCCTCAAAGG	7020
CATTGTGAAC CGTATCCAGT CGGAAGAAAA ATTAGAAAACC AACTCAACCG TATGGCAGAA	7080
ACAGGCCCGGA CGCGGCAGCA CTATCGAAAC GCTAAAACTG CCCAGCTTCG AAAGCCCTAC	7140
TCCGCCCAAA TTGTCCGCAC CCGGCGGCTA TATCGTCGAC ATTCCGAAAG GCAATCTGAA	7200
AACCGAAATC GAAAAGCTGT CCAAACAGCC CGAGTATGCC TATCTGAAAC AGCTCCAAGT	7260
AGCGAAAAAC ATCAACTGGA ATCAGGTGCA GCTTGCTTAC GACAGATGGG ACTACAAACA	7320
GGAGGGCTTA ACCGAAGCAG GTGCGGCGAT TATCGCACTG GCCGTTACCG TGGTCACCTC	7380
AGGCGCAGGA ACCGGAGCCG TATTGGGATT AAACGGTGCG GCCGCCGCCG CAACCGATGC	7440
AGCATTCGCC TCTTTGGCCA GCCAGGCTTC CGTATCGTTC ATCAACAACA AAGGCGATGT	7500
CGGCAAAACC CTGAAAGAGC TGGGCAGAAG CAGCACGGTG AAAAAATCTGG TGGTTGCCGC	7560
CGCTACCGCA GCGTAGCCG ACAAATCGG CGCTTCGGCA CTGAACAATG TCAGCGATAA	7620
GCAGTGGATC AACAACTGA CCGTCAACCT AGCCAATGCG GGCAGTGCCG CACTGATTAA	7680
TACCGCTGTC AACGGCGGCA GCCTGAAAGA CAATCTGAA GCGAATATCC TTGCGGCTTT	7740
GGTCAATACC GCGCATGGAG AAGCAGCCAG TAAAATCAAA CAGTTGGATC AGCACTACAT	7800
AGTCCACAAG ATTGCCCATG CCATAGCGGG CTGTGCGGCA GCGGCGGCGA ATAAGGGCAA	7860
GTGTCAGGAT GGTGCGATAG GTGCGGCTGT GGGCGAGATA GTCGGGGAGG CTTTGACAAA	7920
CGGCAAAAAT CCTGACACTT TGACAGCTAA AGAACGCGAA CAGATTTTGG CATAAGCAA	7980
ACTGGTTGCC GGTACGGTAA GCGGTGTGGT CGGCGGCGAT GTAAATGCGG CGGCGAATGC	8040
GGCTGAGGTA GCGGTGAAAA ATAATCAGCT TAGCGACAAA GAGGGTAGAG AATTTGATAA	8100

CGAAATGACT GCATGCGCCA AACAGAATAA TCCTCAACTG TGCAGAAAAA ATACTGTAAA	9160
AAAGTATCAA AATGTTGCTG ATAAAAGACT TGCTGCTTCG ATTGCAATAT GTACGGATAT	9220
ATCCCGTAGT ACTGAATGTA GAACAATCAG AAAACAACAT TTGATCGATA GTAGAAGCCT	9290
TCATTCATCT TGGGAAGCAG GTCTAATTGG TAAAGATGAT GAATGGTATA AATTATTGAG	9340
CAAATCTTAC ACCCAAGCAG ATTTGGCTTT ACAGTCTTAT CATTTGAATA CTGCTGCTAA	9400
ATCTTGGCTT CAATCGGGCA ATACAAAGCC TTTATCCGAA TGGATGTCCG ACCAAGGTTA	9460
TACACTTATT TCAGGAGTTA ATCCTAGATT CATTCCAATA CCAAGAGGGT TTGTAAACA	9520
AAATACACCT ATTACTAATG TCAAATACCC GGAAGGCATC AGTTTCGATA CAAACCTAAA	9580
AAGACATCTG GCAAATGCTG ATGGTTTTAG TCAAGAACAG GGCATTAAAG GAGCCCATAA	9640
CCGCACCAAT TTTATGGCAG AACTAAATTC ACGAGGAGGA CCGTAAAT CTGAAACCCA	9700
AACTGATATT GAAGGCATTA CCCGAATTAA ATATGAGATT CCTACACTAG ACAGGACAGG	9760
TAAACCTGAT GGTGGATTTA AGGAAATTTT AAGTATAAAA ACTGTTTATA ATCCTAAAAA	9820
ATTTTCTGAT GATAAATAC TTCAAATGGC TCAAATGCT GCTTCACAAG GATATTCAAA	9880
AGCCTCTAAA ATTGCTCAA ATGAAAGAAC TAAATCAATA TCGGAAAGAA AAAATGTCAT	9940
TCAATTCTCA GAAACCTTTG ACGGAATCAA ATTTAGATCA TATTTTGATG TAAATACAGG	9000
AAGAATTACA AACATTACCC CAGAATAATT TAAAGGAAAA ATTATGAAAA ATAATATTTT	9060
TCTAACTTA AATAAAAAAT CTATAAATA CAACCATTTT GTTATTTTGA TTTTTTTTGA	9120
AACAATTTAC CAATTTGAAA CTAAAGATAC GCTTTTAGAG TGTTTTAAAA ATATTACAAC	9180
TACCGGACAT TTTGGAGTAA TAGGTGCTCA ATATGAAAAA ATAGATGCTA CCAGATGGAT	9240
TGGAGATTAT GAAGAGGTAA ATGGATTGTA GTATATTGAT AAAGCTCCTT CTATTTATTT	9300
TTGAGTTGGA GATGATTICA ATCCTGAAGA ATTAATTATA CCTATTAATT TAGCATATCA	9360
TTACTTTAAT ATTGCAATAT CTGATTTCTT AATAGCTCAC CCTGAATATC AAAAAAAGTG	9420
TAAAGAAATA CAAAAACAT ATTCTCAAAC AAAGTGTAGC CTGCATGAAA CCTAAAATCC	9480

ATGCGTAAGG TGTGTGCTTC AGCACGCACG CGTTCATGA TTTACGGCTC AATGCCGTCT	9540
GAAAAGCTCA CAATTTTTC ACGGSCATTT GTTATGCAAG TAAATATTCA GATTCCCTAT	9600
ATACTGCCCC GACGCGTGCG TGCTGAAGAC ACCCCCTACG CTTGCTGCAG AACTTTCGGG	9660
TAAAACCGGT GTGAGCATT A GCGACCGTA TGCCAATGAG AACAGTCGCA TCCTGCTCAG	9720
CACCACGGAT ATCAGTTCCG AAAACGGCAA AATCAAAATT CAATCTTACG GTGACCAATA	9780
TTACTATGCG AGACAGAGCG AACTCTATAC CTTTGAACGC CGCAGCTACA AAAGTGGCAA	9840
ATGGTACAAC CGCAAACACA TTACCGAAGT CAAAGAACAC AAAAACGCCA AGCCCGACGC	9900
AGTAAACCTC AGCGCATCCC AAGGCATCGA CATCAAATCT GGTGGCAGCA TCGACGCCTA	9960
CGCCACCGCA TTGGATGCCC CCAAAGGCAG CATTAAACATC GAAGCCGGGC GGAAATTGAC	10020
ACTCTATGCC GTAGAAGAGC TCAACTACGA CAACTAGAC AGCCAAAAA GGCGCAGATT	10080
TCTCGGCATC AGCTACAGCA AAGCACACGA CACCACCACC CAAGTCATGA AAACCGCGCT	10140
GCCCTCAAGG GTAGTTGCAG AATCAGCCAA CTTCCAATCG GGCTGGGATA CCAAAGTGCA	10200
AGGCACACAG TTTGAAACCA CACTGGGTGG CGCAACCATA CGCGCAGGCG TAGGTGAGCA	10260
GGCACGGGCA GATGCCAAGA TTATCCTCGA AGGGATCAAA AGCAGCATCC ACACAGAAAC	10320
CSTGAGCAGC AGCAAATCTA CTCTATGGCA AAAACAGGCA GGACGGGGCA GTAACATCGA	10380
AACCTTGCAA TTGCCGAGIT TCACCGGTCC CGTTGCGCCC GTACTGTCCG CACCGGGCGG	10440
TTACATTGTC GACATTCCGA AAGGCAATCT GAAAACCCAA ATCGAAACCC TCACCAAGCA	10500
GCCCGAGTAT GCTTATTTGA AACAACTTCA AGTTGCGAAA AACATCAACT GGAATCAGGT	10560
GCAGCTTGCT TACGATAAAT GGGACTACAA ACAGGAGGGC ATGACACCCG CAGCAGCAGC	10620
TGTCGTCGTT ATCGTCGTAA CGGTATTGAC CTACGGTGCA CTGTCCGCCC CGGCAGCCGC	10680
CGGAACGGCG GCGCGGCAG GCGCAGGAGC GGGAGGAGCC GCAGCAGGAA CGGCAGCCGG	10740
AACTGGAGTA GCAGCAGGAA CGGCAGCCAC AACCGGAGTA GCAGCAGGCA CATCAGCTGC	10800

AGCTATCACC ACAGCCGCAG GCAAAGCCGC ACTGGCCAGT CTCGCCAGCC AAGCCGCAGT 10860
TTCCCTCATC AACAAACAAAG GAGACATAAA CCATACCCTG AAAGAACTGG GCAAAAGCAG 10920
CACCGTCAGA CAGGCCGCCA CCGCCGCCGT AACCSCAGGC GTACTGCAGG GCATAAGCGG 10980
GCTGAACACC CAAGCAGCCG AAGCCGTCAG CAAACATTTT CACAGTCCCG CAGCAGGCAA 11040
ACTGACCGCT AACCTGATCA ACAGCACCCG TGCCGCAAGT GTCCATACCG CCATCAACGG 11100
CGGCAGCCTG AAAGACAAC TGGGCGATGC CGCACTGGGT GCGATAGTCA GTACCGTACA 11160
CGGAGAAGTA GCGAGCAAAA TCAAATTTAA TCTCAGCGAA GACTACATTG CCCACAAGAT 11220
AGCCCATGCC GTAGCAGGCT GTGCATCCGC GGTAGCAAAT AAAGGCAAAT GTCGGGACGG 11280
CGCAATCGGC GCGGCAGTCG GCGAGATGCT GGGAGAAACC CTGTTGGACG GACGCGATGT 11340
AGGCAAAC TGACCCCAAG AACGCCAAAA AGTCATAGCC TACTCGCAGA TTATCGCAGG 11400
CAGCGCAGTG GCATTGGTTA AAGGGGATGT GAATACGGCG GTGAATGCGG CTA CTGTGGC 11460
AGTGGAGAAT AATAGTCTTT TAGCTCGCAG GAGGGTAAAT ATACGTTGGA CTCCGCGACA 11520
AGAATTGGAA CATGAATATG CCATTCTTGA AATCCAGGCC ATTACCAATC AAATCCGAAG 11580
GCTGGATCCG AAATTTAACG GGATTGCTAT TCTGAGGACT CCTGGAGAGC CGTGGACAAG 11640
ACATGATGTA CAAACATACA GGCAATATTA TAATCAATTA AGGGAATCCA GAGGCTTTGC 11700
TGTTGAACCA ATTTATAGAA TCAGGATAAA CAACGGCAAT GAATTTAACC GTATCATGTC 11760
ATCAAAATAC CTTATAATG AGCTTTATGT AGCCAATCCT AAATCGGCGA CGGGGTATTT 11820
TAGGGTAGAT TCGTATGATC CTGCGACAAG GGAAATTATT TCAAGAAAAT TTACCCAATT 11880
TTCTCAAATC CAAGAAAGTA CGGGGATTGG TTATATCAAG GAGGCTGTTA GAAAAATAG 11940
CCCTGGTACT GTCATTTCCA ATGTTCCAAG TACACCTACT ACGATAAGAG GAAGAAAGCT 12000
TGAAGGAAAA GTTATTTTAG AAGTTCCTGC TCAGGTCAAT CCAATTCCAC AATCTGTATT 12060
AAGGGCGGCA CAAGAAGAAA ATGTTATCAT TAGAGATACA ACAGGAAGGA TTTACAAATG 12120
AAGAAAGATA TTTTATTG TGAGCAGTGG TCTTATGGTT ATAAGAGACT TCATAAGCCT 12180

TTTTCTGAGA AACAAAGCTGA GGAAAAACAT CTTAAAGGGG AGTTATATAC TGCCGTAATA 12240
GGTTCGGCGA CACAACCTGA ATATGTAATT ACCTTGGGAG AGGAAGTAGG TTTTTTTTCG 12300
GTAAATTTTT TCGATAAATT TGGAAGGGAT TATTTAACCC ATCAATTTCA AAAATATTCC 12360
AATTCGAATT ATTATTTTCT TTCTATGGCT GTATGGAGAG ATTATATAAC TTGGAATCT 12420
CATGACTTAG CAGAAGGATA TACTTATTTT TCATGAAA ATACGGATGA TTGCTATGTT 12480
TTGAAACAAG ATTTTATTAA TAATGAGCGA TATGAAAAA CAGAATTATA TTCCCAAAAA 12540
GATAAGGTAA TTCTATTTCC AAAGTTTGGT GAATATGATT TGGTGTTAAA TCCGGACATT 12600
ATTTAATTAA GTTTTAAGGC CGTCTGAAAA AAATTTCAAA CGGCTTTTAT TATTGGGTTT 12660
GGAATCTGAG GATAAAGCTG ATAAAAACCA GGAAATTATC AGATTGCTAT ATACGTATTG 12720
TTGTACAGAC TAAAGGCAGC AATCAAATCA CTATTGCTTA CCCACAAAAA TAAATTGATT 12780
ATATGGAATA ATCATGAATA AGAGAATGAA AATGTGTCCT GCTTGTCAAC AAGGCTATCT 12840
CTACCATTCC AAACCTAAAT ATCTTCATGA TGAAATTATT CTGTGTGATG AATGCGATGC 12900
AGTATGGCTC AAAGGTATGA ATATATTTTA TGGAGAATAT GAAAAAGATT TTTATTCTTA 12960
TGTTCCTTTC ATGGAATCCC AAGGTATAAC GAGTGAATGT ATTTGGGAAG GAGATTTGTT 13020
TGATCATCCA TATTATGAAG ATGAAAACTC AAATGATATG GATTGATGGA AATTTTAAGC 13080
CTGCGTAGGT ACGATTAGCC ATCAAACGGC GTAATCATAC GCAAGATTAT CAACAGAGAG 13140
GGCTGGCAGC GATATACCAC CCACAAGATT GCCCATGCCA TAGCGGGCTG TGCGGCAGCG 13200
GCGGCGAATA AGGGCAAGTG TCAGGATGGT GCGATAGGCG CTGCAGTCGG TGAGATTGTT 13260
GGTGAGGCTT TGGTTAAGAA TACTGATTTT AGTCGTATGA GTGCGACCGA AATCGAAAAA 13320
GCTAAAGCGA AGATTACTGC CTATTCAAAA CTGGTTGCCG GCACTGCGTC TGCCGTTGTA 13380
GGCGGGGATG TGAATACAGC GGCGAATGCG GCACAGATAG CGGTGGAGAA TAATACTTTG 13440
TATCCTAGAT GCGTTGGTGC AAAGTGTGAT GAATTTCAAA AGGAACAACA AAAATGGATA 13500

CGTGAAAATC CTGAAGAATA TCGAGAAGTT TTGCTTTTTC AGACAGGATT TATTCCAATT 13560
ATCGGTGATA TACAGAGTTT TGTACAAGCA CAGACCGCTG CCGATCACCT GTTTGCTTTG 13620
CTGGGTGTGG TTCCGGGTAT CCGTGAATCG ATACAGGCCT ATAAAGTAGC GAAAGCGGCA 13680
AAAAATTTAC AAGGCATGAA AAAAGCCTTG GACAAGGCAG CAACCGTTGC CACTGCACAG 13740
GGCTATGTCA GCAAAACCAA AATCAAAATC GGTCAAACCTG AATTAAGGGT TACTGCAGCA 13800
ACTGACAAAC AATTGCTGAA AGCTATTGGC GAAGGAAGGG ACACGACAGG TAAAATGACC 13860
GAGCAGTTAT TTGACTCTTT AGCTAAACAA AATGGCTTCA GAGTGCTTTC GGGCGGCAAA 13920
TACGGCGGAA ATAACGGTTT TGATCATGTA TGGCAGGCTG CCGATGGTAG TGTCGTTTTG 13980
ATTGTAGAAA GTAAGCAGAT TAGGAACGGT ACGGTACAGC TGAATCCGAA TGGTGCGGGT 14040
GGATATACGC AAATGAGTGA GGATTGGATT AGACAAGTTT TAGATCAATT ACCCGATGGT 14100
AGTCCCGCTA AAGCTGCTGT CTTCAAAGCA AATAAGAACG GCACATTAAA AACAGCAATA 14160
GCAGGCGTTG ATCGTCAAAC AGGTAAGGCC GTTATTCTTC CTGTCAAAGT TCCTTCTAAA 14220
ACCAATATAA GGAGATAACA ATGGGGCACA ATATGATGAC CACCCAAAAA TGGTATGAGC 14280
ATATTACTAA TGTAATCATA GGCAATACTG CTAATTTCAA TAGCGGTTGC CTTGACTCTA 14340
TAGATTATGT AGATGAAAGA AAAGGCGTTC CGCTTGACAGC TATGCAACAT ATTTTCATGG 14400
ACGTTAGAGC TGCAGCTTCC CATGCCTATC TATTTGAACA TGATCTTAAG AAATTCAAGC 14460
AATATGCTTA TGTTGCAGGA AAGCTGGGGG TTTTGCTGAG TGTAATTCT ACAGACCCTG 14520
AACCCTTCTT CTTTCCCTGT GACATGCTCA ACATTCAAAA TCCGATGTTT CTGATGCTGA 14580
TGAGCGACAG CCCACAGCTG CGTGAGTTTC TGGTGCGCAA TATCGACAAC ATCGCCAACG 14640
ATACAGAAGC CTTTATAAAC CGCTACGACC TCAACCGGCA TATGATTTAC AATACTCTGC 14700
TGATGGTGGA GGGTAAGCAG CTTGATCGGT TGAAACAACG TAGCGAGAAA GTCTTGCGGC 14760
ATCCCACCCC TAGCAAATGG CTGCAAAAGC GGTGTACGA TTACCGCTTC TTCCTCGCTT 14820
TCGCCGAACA GGATGCCGAG GCAATGAAAG CCGCCTTAGA GCGCTTTTC GATAAAAAAA 14880

78

CCGCGCGTAT GGCTGCCAAA GAAACATTGT CCTATTTTGA TTTCTACCTG CAGCCGCAAA 14940
 TCGTTACCTA CCCCCAAAATC GCATCCATGC ACGGTTTTGA TTTGGGCATA GATCAAGAAA 15000
 TCTCACCAGAG GGATTTGATT GTTTACGATC CGCTGCCGGC AGACGAATAT CAAGACATCT 15060
 TCGATTTTAT GAAACAGTAT GACTTGTCTT ACCCGTATGA ATATCTGCAG GATTGGATAG 15120
 ATTACTATAC GTTCAAAACC GATAAGCTGG TATTTGGTAA CGCGAAGCGA GAGTGAGCCG 15180
 TAAAACTCTG AGCTCCTGTT TTATAGATTA CAACTTTAGG CCSTCTTAAA GCTGAAAGAT 15240
 TTTCGAAAGC TATAAATTGA AGCCCTTCCA CAGTACATAG ATCTGTGTTG TGGCGGGGCT 15300
 TTACCACGCT GATTGCCGGA GAAGAACTCA ACCTGCTGGC AAAACAAGGC ATGAGATCTT 15360
 TGCAATAACA TGAGTTGAGA CTTTTCGAAA AAAGCCCTTC CCGGACATCC GAAACCCAAA 15420
 CACAGGATTT CGGCTGTTTT GTTACCAAAT ACCTCCTAAT TTTACCCAAA TACCCCTTA 15480
 ATCCTCCTCG GACACCCGAT AATCAGGCAT CCGGGCTGCC TTTTAGGCGG CAGCGGGCGC 15540
 ATTTAGCCTG TTGGCCGCTT TCAACAGGTT CAAACACATC GCCTTCAGGT GGCTTTGCGC 15600
 ACTCACTTTG TCATTTCCAA 15620

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 580 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Protein
- (B) EMPLACEMENT: 1..580

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

Met Lys Phe Phe Pro Ala Pro Cys Leu Leu Val Ile Leu Ala Val Ile
 1 5 10 15

79

Pro Leu Lys Thr Leu Ala Ala Asp Glu Asn Asp Ala Glu Leu Ile Arg
20 25 30

Ser Met Gln Arg Gln Gln His Ile Asp Ala Glu Leu Leu Thr Asp Ala
35 40 45

Asn Val Arg Phe Glu Gln Pro Leu Glu Lys Asn Asn Tyr Val Leu Ser
50 55 60

Glu Asp Glu Thr Pro Cys Thr Arg Val Asn Tyr Ile Ser Leu Asp Asp
65 70 75 80

Lys Thr Ala Arg Lys Phe Ser Phe Leu Pro Ser Val Leu Met Lys Glu
85 90 95

Thr Ala Phe Lys Thr Gly Met Cys Leu Gly Ser Asn Asn Leu Ser Arg
100 105 110

Leu Gln Lys Ala Ala Gln Gln Ile Leu Ile Val Arg Gly Tyr Leu Thr
115 120 125

Ser Gln Ala Ile Ile Gln Pro Gln Asn Met Asp Ser Gly Ile Leu Lys
130 135 140

Leu Arg Val Ser Ala Gly Glu Ile Gly Asp Ile Arg Tyr Glu Glu Lys
145 150 155 160

Arg Asp Gly Lys Ser Ala Glu Gly Ser Ile Ser Ala Phe Asn Asn Lys
165 170 175

Phe Pro Leu Tyr Arg Asn Lys Ile Leu Asn Leu Arg Asp Val Glu Gln
180 185 190

Gly Leu Glu Asn Leu Arg Arg Leu Pro Ser Val Lys Thr Asp Ile Gln
195 200 205

Ile Ile Pro Ser Glu Glu Glu Gly Lys Ser Asp Leu Gln Ile Lys Trp
210 215 220

Gln Gln Asn Lys Pro Ile Arg Phe Ser Ile Gly Ile Asp Asp Ala Gly
225 230 235 240

Gly Lys Thr Thr Gly Lys Tyr Gln Gly Asn Val Ala Leu Ser Phe Asp
245 250 255

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

80

Asn Pro Leu Gly Leu Ser Asp Leu Phe Tyr Val Ser Tyr Gly Arg Gly
 260 265 270

Leu Val His Lys Thr Asp Leu Thr Asp Ala Thr Gly Thr Glu Thr Glu
 275 280 285

Ser Gly Ser Arg Ser Tyr Ser Val His Tyr Ser Val Pro Val Lys Lys
 290 295 300

Trp Leu Phe Ser Phe Asn His Asn Gly His Arg Tyr His Glu Ala Thr
 305 310 315 320

Glu Gly Tyr Ser Val Asn Tyr Asp Tyr Asn Gly Lys Gln Tyr Gln Ser
 325 330 335

Ser Leu Ala Ala Glu Arg Met Leu Trp Arg Asn Arg Phe His Lys Thr
 340 345 350

Ser Val Gly Met Lys Leu Trp Thr Arg Gln Thr Tyr Lys Tyr Ile Asp
 355 360 365

Asp Ala Glu Ile Glu Val Gln Arg Arg Arg Ser Ala Gly Trp Glu Ala
 370 375 380

Glu Leu Arg His Arg Ala Tyr Leu Asn Arg Trp Gln Leu Asp Gly Lys
 385 390 395 400

Leu Ser Tyr Lys Arg Gly Thr Gly Met Arg Gln Ser Met Pro Ala Pro
 405 410 415

Glu Glu Asn Gly Gly Gly Thr Ile Pro Gly Thr Ser Arg Met Lys Ile
 420 425 430

Ile Thr Ala Gly Leu Asp Ala Ala Ala Pro Phe Met Leu Gly Lys Gln
 435 440 445

Gln Phe Phe Tyr Ala Thr Ala Ile Gln Ala Gln Trp Asn Lys Thr Pro
 450 455 460

Leu Val Ala Gln Asp Lys Leu Ser Ile Gly Ser Arg Tyr Thr Val Arg
 465 470 475 480

Gly Phe Asp Gly Glu Gln Ser Leu Phe Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Trp
 485 490 495

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

81

Gln Asn Thr Leu Thr Trp Tyr Phe His Pro Asn His Gln Phe Tyr Leu
 500 505 510

Gly Ala Asp Tyr Gly Arg Val Ser Gly Glu Ser Ala Gln Tyr Val Ser
 515 520 525

Gly Lys Gln Leu Met Gly Ala Val Val Gly Phe Arg Gly Gly His Lys
 530 535 540

Val Gly Gly Met Phe Ala Tyr Asp Leu Phe Ala Gly Lys Pro Leu His
 545 550 555 560

Lys Pro Lys Gly Phe Gln Thr Thr Asn Thr Val Tyr Gly Phe Asn Leu
 565 570 575

Asn Tyr Ser Phe
 580

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1981 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Peptide
- (B) EMBLEMMENT: 1..1981

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

Met Asn Lys Gly Leu His Arg Ile Ile Phe Ser Lys Lys His Ser Thr
 1 5 10 15

Met Val Ala Val Ala Glu Thr Ala Asn Ser Gln Gly Lys Gly Lys Gln
 20 25 30

Ala Gly Ser Ser Val Ser Val Ser Leu Lys Thr Ser Gly Asp Leu Cys
 35 40 45

82

Gly Lys Leu Lys Thr Thr Leu Lys Thr Leu Val Cys Ser Leu Val Ser
 50 55 60

Leu Ser Met Val Leu Pro Ala His Ala Gln Ile Thr Thr Asp Lys Ser
 65 70 75 80

Ala Pro Lys Asn Gln Gln Val Val Ile Leu Lys Thr Asn Thr Gly Ala
 85 90 95

Pro Leu Val Asn Ile Gln Thr Pro Asn Gly Arg Gly Leu Ser His Asn
 100 105 110

Arg Tyr Thr Gln Phe Asp Val Asp Asn Lys Gly Ala Val Leu Asn Asn
 115 120 125

Asp Arg Asn Asn Asn Pro Phe Leu Val Lys Gly Ser Ala Gln Leu Ile
 130 135 140

Leu Asn Glu Val Arg Gly Thr Ala Ser Lys Leu Asn Gly Ile Val Thr
 145 150 155 160

Val Gly Gly Gln Lys Ala Asp Val Ile Ile Ala Asn Pro Asn Gly Ile
 165 170 175

Thr Val Asn Gly Gly Gly Phe Lys Asn Val Gly Arg Gly Ile Leu Thr
 180 185 190

Ile Gly Ala Pro Gln Ile Gly Lys Asp Gly Ala Leu Thr Gly Phe Asp
 195 200 205

Val Arg Gln Gly Thr Leu Thr Val Gly Ala Ala Gly Trp Asn Asp Lys
 210 215 220

Gly Gly Ala Asp Tyr Thr Gly Val Leu Ala Arg Ala Val Ala Leu Gln
 225 230 235 240

Gly Lys Leu Gln Gly Lys Asn Leu Ala Val Ser Thr Gly Pro Gln Lys
 245 250 255

Val Asp Tyr Ala Ser Gly Glu Ile Ser Ala Gly Thr Ala Ala Gly Thr
 260 265 270

Lys Pro Thr Ile Ala Leu Asp Thr Ala Ala Leu Gly Gly Met Tyr Ala
 275 280 285

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

83

Asp Ser Ile Thr Leu Ile Ala Asn Glu Lys Gly Val Gly Val Lys Asn
 290 295 300

Ala Gly Thr Leu Glu Ala Ala Lys Gln Leu Ile Val Thr Ser Ser Gly
 305 310 315 320

Arg Ile Glu Asn Ser Gly Arg Ile Ala Thr Thr Ala Asp Gly Thr Glu
 325 330 335

Ala Ser Pro Thr Tyr Leu Ser Ile Glu Thr Thr Glu Lys Gly Ala Ala
 340 345 350

Gly Thr Phe Ile Ser Asn Gly Gly Arg Ile Glu Ser Lys Gly Leu Leu
 355 360 365

Val Ile Glu Thr Gly Glu Asp Ile Ser Leu Arg Asn Gly Ala Val Val
 370 375 380

Gln Asn Asn Gly Ser Arg Pro Ala Thr Thr Val Leu Asn Ala Gly His
 385 390 395 400

Asn Leu Val Ile Glu Ser Lys Thr Asn Val Asn Asn Ala Lys Gly Ser
 405 410 415

Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Arg Thr Thr Ile Asn Asp Ala Thr Ile
 420 425 430

Gln Ala Gly Ser Ser Val Tyr Ser Ser Thr Lys Gly Asp Thr Glu Leu
 435 440 445

Gly Glu Asn Thr Arg Ile Ile Ala Glu Asn Val Thr Val Leu Ser Asn
 450 455 460

Gly Ser Ile Gly Ser Ala Ala Val Ile Glu Ala Lys Asp Thr Ala His
 465 470 475 480

Ile Glu Ser Gly Lys Pro Leu Ser Leu Glu Thr Ser Thr Val Ala Ser
 485 490 495

Asn Ile Arg Leu Asn Asn Gly Asn Ile Lys Gly Gly Lys Gln Leu Ala
 500 505 510

Leu Leu Ala Asp Asp Asn Ile Thr Ala Lys Thr Thr Asn Leu Asn Thr
 515 520 525

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

84

Pro Gly Asn Leu Tyr Val His Thr Gly Lys Asp Leu Asn Leu Asn Val
 530 535 540

Asp Lys Asp Leu Ser Ala Ala Ser Ile His Leu Lys Ser Asp Asn Ala
 545 550 555 560

Ala His Ile Thr Gly Thr Ser Lys Thr Leu Thr Ala Ser Lys Asp Met
 565 570 575

Gly Val Glu Ala Gly Leu Leu Asn Val Thr Asn Thr Asn Leu Arg Thr
 580 585 590

Asn Ser Gly Asn Leu His Ile Gln Ala Ala Lys Gly Asn Ile Gln Leu
 595 600 605

Arg Asn Thr Lys Leu Asn Ala Ala Lys Ala Leu Glu Thr Thr Ala Leu
 610 615 620

Gln Gly Asn Ile Val Ser Asp Gly Leu His Ala Val Ser Ala Asp Gly
 625 630 635 640

His Val Ser Leu Leu Ala Asn Gly Asn Ala Asp Phe Thr Gly His Asn
 645 650 655

Thr Leu Thr Ala Lys Ala Asp Val Asn Ala Gly Ser Val Gly Lys Gly
 660 665 670

Arg Leu Lys Ala Asp Asn Thr Asn Ile Thr Ser Ser Ser Gly Asp Ile
 675 680 685

Thr Leu Val Ala Gly Asn Gly Ile Gln Leu Gly Asp Gly Lys Gln Arg
 690 695 700

Asn Ser Ile Asn Gly Lys His Ile Ser Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn
 705 710 715 720

Ala Asp Leu Lys Asn Leu Asn Val His Ala Lys Ser Gly Ala Leu Asn
 725 730 735

Ile His Ser Asp Arg Ala Leu Ser Ile Glu Asn Thr Lys Leu Glu Ser
 740 745 750

Thr His Asn Thr His Leu Asn Ala Gln His Glu Arg Val Thr Leu Asn
 755 760 765

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

85

Gln Val Asp Ala Tyr Ala His Arg His Leu Ser Ile Thr Gly Ser Gln
770 775 780

Ile Trp Gln Asn Asp Lys Leu Pro Ser Ala Asn Lys Leu Val Ala Asn
785 790 795 800

Gly Val Leu Ala Leu Asn Ala Arg Tyr Ser Gln Ile Ala Asp Asn Thr
805 810 815

Thr Leu Arg Ala Gly Ala Ile Asn Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Val
820 825 830

Lys Arg Gly Asn Ile Asn Trp Ser Thr Val Ser Thr Lys Thr Leu Glu
835 840 845

Asp Asn Ala Glu Leu Lys Pro Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ile Glu Ala
850 855 860

Gly Ser Gly Thr Leu Thr Ile Glu Pro Ala Asn Arg Ile Ser Ala His
865 870 875 880

Thr Asp Leu Ser Ile Lys Thr Gly Gly Lys Leu Leu Leu Ser Ala Lys
885 890 895

Gly Gly Asn Ala Gly Ala Pro Ser Ala Gln Val Ser Ser Leu Glu Ala
900 905 910

Lys Gly Asn Ile Arg Leu Val Thr Gly Glu Thr Asp Leu Arg Gly Ser
915 920 925

Lys Ile Thr Ala Gly Lys Asn Leu Val Val Ala Thr Thr Lys Gly Lys
930 935 940

Leu Asn Ile Glu Ala Val Asn Asn Ser Phe Ser Asn Tyr Phe Pro Thr
945 950 955 960

Gln Lys Ala Ala Glu Leu Asn Gln Lys Ser Lys Glu Leu Glu Gln Gln
965 970 975

Ile Ala Gln Leu Lys Lys Ser Ser Pro Lys Ser Lys Leu Ile Pro Thr
980 985 990

Leu Gln Glu Glu Arg Asp Arg Leu Ala Phe Tyr Ile Gln Ala Ile Asn
995 1000 1005

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

86

Lys Glu Val Lys Gly Lys Lys Pro Lys Gly Lys Glu Tyr Leu Gln Ala
 1010 1015 1020

Lys Leu Ser Ala Gln Asn Ile Asp Leu Ile Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 1025 1030 1035 1040

Ile Ser Gly Ser Asp Ile Thr Ala Ser Lys Lys Leu Asn Leu His Ala
 1045 1050 1055

Ala Gly Val Leu Pro Lys Ala Ala Asp Ser Glu Ala Ala Ala Ile Leu
 1060 1065 1070

Ile Asp Gly Ile Thr Asp Gln Tyr Glu Ile Gly Lys Pro Thr Tyr Lys
 1075 1080 1085

Ser His Tyr Asp Lys Ala Ala Leu Asn Lys Pro Ser Arg Leu Thr Gly
 1090 1095 1100

Arg Thr Gly Val Ser Ile His Ala Ala Ala Ala Leu Asp Asp Ala Arg
 1105 1110 1115 1120

Ile Ile Ile Gly Ala Ser Glu Ile Lys Ala Pro Ser Gly Ser Ile Asp
 1125 1130 1135

Ile Lys Ala His Ser Asp Ile Val Leu Glu Ala Gly Gln Asn Asp Ala
 1140 1145 1150

Tyr Thr Phe Leu Lys Thr Lys Gly Lys Ser Gly Lys Ile Ile Arg Lys
 1155 1160 1165

Thr Lys Phe Thr Ser Thr Arg Asp His Leu Ile Met Pro Ala Pro Val
 1170 1175 1180

Glu Leu Thr Ala Asn Gly Ile Thr Leu Gln Ala Gly Gly Asn Ile Glu
 1185 1190 1195 1200

Ala Asn Thr Thr Arg Phe Asn Ala Pro Ala Gly Lys Val Thr Leu Val
 1205 1210 1215

Ala Gly Glu Glu Leu Gln Leu Leu Ala Glu Glu Gly Ile His Lys His
 1220 1225 1230

Glu Leu Asp Val Gln Lys Ser Arg Arg Phe Ile Gly Ile Lys Val Gly
 1235 1240 1245

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Lys Ser Asn Tyr Ser Lys Asn Glu Leu Asn Glu Thr Lys Leu Pro Val
 1250 1255 1260

Arg Val Val Ala Gln Thr Ala Ala Thr Arg Ser Gly Trp Asp Thr Val
 1265 1270 1275 1280

Leu Glu Gly Thr Glu Phe Lys Thr Thr Leu Ala Gly Ala Asp Ile Gln
 1285 1290 1295

Ala Gly Val Gly Glu Lys Ala Arg Val Asp Ala Lys Ile Ile Leu Lys
 1300 1305 1310

Gly Ile Val Asn Arg Ile Gln Ser Glu Glu Lys Leu Glu Thr Asn Ser
 1315 1320 1325

Thr Val Trp Gln Lys Gln Ala Gly Arg Gly Ser Thr Ile Glu Thr Leu
 1330 1335 1340

Lys Leu Pro Ser Phe Glu Ser Pro Thr Pro Pro Lys Leu Ser Ala Pro
 1345 1350 1355 1360

Gly Gly Tyr Ile Val Asp Ile Pro Lys Gly Asn Leu Lys Thr Glu Ile
 1365 1370 1375

Glu Lys Leu Ser Lys Gln Pro Glu Tyr Ala Tyr Leu Lys Gln Leu Gln
 1380 1385 1390

Val Ala Lys Asn Ile Asn Trp Asn Gln Val Gln Leu Ala Tyr Asp Arg
 1395 1400 1405

Trp Asp Tyr Lys Gln Glu Gly Leu Thr Glu Ala Gly Ala Ala Ile Ile
 1410 1415 1420

Ala Leu Ala Val Thr Val Val Thr Ser Gly Ala Gly Thr Gly Ala Val
 1425 1430 1435 1440

Leu Gly Leu Asn Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ala Ala Phe Ala
 1445 1450 1455

Ser Leu Ala Ser Gln Ala Ser Val Ser Phe Ile Asn Asn Lys Gly Asp
 1460 1465 1470

Val Gly Lys Thr Leu Lys Glu Leu Gly Arg Ser Ser Thr Val Lys Asn
 1475 1480 1485

88

Leu Val Val Ala Ala Ala Thr Ala Gly Val Ala Asp Lys Ile Gly Ala
 1490 1495 1500

Ser Ala Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Gln Trp Ile Asn Asn Leu Thr
 1505 1510 1515 1520

Val Asn Leu Ala Asn Ala Gly Ser Ala Ala Leu Ile Asn Thr Ala Val
 1525 1530 1535

Asn Gly Gly Ser Leu Lys Asp Asn Leu Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ala
 1540 1545 1550

Leu Val Asn Thr Ala His Gly Glu Ala Ala Ser Lys Ile Lys Gln Leu
 1555 1560 1565

Asp Gln His Tyr Ile Val His Lys Ile Ala His Ala Ile Ala Gly Cys
 1570 1575 1580

Ala Ala Ala Ala Ala Asn Lys Gly Lys Cys Gln Asp Gly Ala Ile Gly
 1585 1590 1595 1600

Ala Ala Val Gly Glu Ile Val Gly Glu Ala Leu Thr Asn Gly Lys Asn
 1605 1610 1615

Pro Asp Thr Leu Thr Ala Lys Glu Arg Glu Gln Ile Leu Ala Tyr Ser
 1620 1625 1630

Lys Leu Val Ala Gly Thr Val Ser Gly Val Val Gly Gly Asp Val Asn
 1635 1640 1645

Ala Ala Ala Asn Ala Ala Glu Val Ala Val Lys Asn Asn Gln Leu Ser
 1650 1655 1660

Asp Lys Glu Gly Arg Glu Phe Asp Asn Glu Met Thr Ala Cys Ala Lys
 1665 1670 1675 1680

Gln Asn Asn Pro Gln Leu Cys Arg Lys Asn Thr Val Lys Lys Tyr Gln
 1685 1690 1695

Asn Val Ala Asp Lys Arg Leu Ala Ala Ser Ile Ala Ile Cys Thr Asp
 1700 1705 1710

Ile Ser Arg Ser Thr Glu Cys Arg Thr Ile Arg Lys Gln His Leu Ile
 1715 1720 1725

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)